



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Anatomia Patológica

Inibidores Checkpoint: Anti-PD1/PDL1 no Cancro Urotelial da Bexiga localmente avançado e/ou metastizado

João Manuel Saraiva Alexandre

JULHO'2018

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Instituto de Anatomia Patológica

Inibidores Checkpoint: Anti-PD1/PDL1 no Cancro Urotelial da Bexiga localmente avançado e/ou metastizado

João Manuel Saraiva Alexandre

Orientado por:

Dra. Lurdes Correia

JULHO'2018

ABSTRACT

Bladder cancer is the 7th most common in the world, with high morbidity and mortality rates. The 90% are of epithelial origin and are characterized by being a heterogeneous disease, with two distinct masks: non-muscle invasive (NMIBC), being a more frequent indication, and invasive muscle (MIBC), with worse prognosis, that has Radical cystectomy with or without chemotherapy based on platinum and / or fractional radiotherapy reference the standard treatment. There are different histological variants, with diagnostic, prognostic and therapeutic importance. Recurrence and progression rates are a reality as they are more effective, in detecting a more effective disease, with more recent results in terms of patient survival and quality of life. The degeneration of tumor control in the sense of recognizing an anti-tumor immune response and a more in-depth knowledge of the functioning of the immune checkpoints, is CTLA-4 and PD-1 / PDL-1, ushered in a new era in treatment oncology, an immunotherapy. The checkpoints are the following molecular indicators, capable of stopping an immune response. The truth is the use of immunotherapy in cancer of the bladder for data of the 70 years, when they introduced the BCG as part of the process of non-invasive. Studies on the use of anti-PD1 / PDL1 inhibitors have been followed up by promising drugs, so the five have already been conducted by the FDA for second-line locally advanced and / or metastatic urothelial cancer therapy (atezolizumab, durvalumab, avelumab, pembrolizumab and nivolumab), two of which (pembrolizumab and atezolizumab) are in use for the first line, in the case of patients found ineligible for cisplatin. This is to the techniques this new ones are in the therapy and chemotherapies, which have been tested in their comilapy and the therapy have been proven their without initial synergists. Given the toxicity of chemotherapy and a large dose of patients, immunotherapy requires a key role in this area, demonstrating an increase in overall survival and disease progression free time. Dermatitis, fatigue and diarrhea are the most prevalent adverse factors of the antibodies, and autoimmunity is a problem to be solved, given the importance of PD-1 in the processes of self-tolerance. However, these are the smallest and most intense ones that exist in chemotherapy. Although it is a little promising, its liquidation is not maximum, with a great variability of responses. This phenomenon is due to a mechanism of primary resistance, such as changes in tumor microenvironment, signatures of anti-PD1 innate resistance and intrinsic tumor factors; Tumor neurogenesis, tumor neurogenesis mutations, JAK1 / JAK2 gene mutations, β 2-microglobulin mutations and epigenetic stability of

"exhausted" T cells. Given this genetically molecular-cellular, imperative to biomarkers that frees a selection of patients, for an increasingly efficient, personalized and individualized trait. The first to be studied was the PDL-1, and until today, a linear correlation has not been found that allows predicting a therapeutic response, having an idea that the expression of its expression is precarious, has been studied. Currently, it is already a process of detection and evaluation of PDL-1 cells in our tumor organs, through the immunohistochemical test "VENTANA PDL-1 (SP142)". The increase of the knowledge of patients is the liposis is also important for the individualization of each patient, even if the directed therapies are also rather limited. Current informants are currently not useful in investigating the role of immunotherapy in both invasive and invasive muscles as well as in locally advanced and / or metastatic invasive muscles such as adjuvant and / or neoadjuvance.

Key-words: Immunotherapy; Bladder Cancer; PDL-1; Urothelial; IHQ

RESUMO

O cancro da bexiga é o 7º mais comum do mundo, estando associado a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade. Mais de 90% são de origem epitelial. É caracterizado por ser uma doença heterogénea, com duas entidades bem distintas: não músculo-invasivo (NMIBC), apresentação mais frequente, e músculo-invasivo (MIBC), com pior prognóstico, em que a cistectomia radical com ou sem quimioterapia baseado na cisplatina e/ou radioterapia fraccionada corresponde ao tratamento *standard*. Dentro de cada entidade clínica, existem diversos variantes histológicos, com importância diagnóstica, prognóstica e terapêutica. As elevadas taxas de recorrência e progressão são uma realidade, pelo que existe uma necessidade de encontrar novas terapêuticas, de forma a abordar esta doença de uma forma mais eficaz, com melhores resultados em termos de sobrevivência e qualidade de vida destes pacientes. A descoberta de mecanismos utilizados pelos tumores no sentido de contornar a resposta imunitária anti-tumoral e o conhecimento mais aprofundado do funcionamento dos *checkpoints imunitários*, nomeadamente do CTLA-4 e do PD-1/PDL-1, deu início a uma nova era no tratamento oncológico, a imunoterapia. *Checkpoints imunitários* correspondem a sinais moleculares, capazes de parar uma resposta imunitária. Na verdade, os primeiros passos da imunoterapia no cancro urotelial da bexiga foram dados na década de 70, quando se introduziu o BCG como parte do tratamento da doença não músculo-invasiva. Estudos realizados com a utilização de inibidores anti-PD1/PDL1 têm demonstrado resultados bastante promissores, pelo que cinco deles já foram aprovados pelo FDA para terapêutica de 2ª linha no cancro urotelial localmente avançado e/ou metastizado (Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab, Pembrolizumab e Nivolumab), sendo que dois deles (Pembrolizumab e Atezolizumab) estão aprovados para primeira linha, no caso destes pacientes se encontrarem inelegíveis à cisplatina. É de realçar a importância destas novas terapêuticas, que apresentam uma eficácia e tolerância bastante aceitáveis, tanto isoladamente como em combinação com a quimioterapia e a radioterapia, tendo já sido provados os seus efeitos sinérgicos. Dada a toxicidade da quimioterapia e a grande morbilidade destes doentes, a imunoterapia adquire um papel fundamental nesta área, demonstrando um aumento da sobrevida global e do tempo livre de progressão da doença. A dermatite, fadiga e diarreia são os efeitos adversos mais prevalentes destes anticorpos, sendo que a auto-imunidade é um problema a ser equacionado, dada a importância do PD-1 nos processos de auto-tolerância. Contudo, estes efeitos são em menor número e

intensidade do que os da quimioterapia. Apesar de ser um tratamento bastante promissor, a sua eficácia não é máxima, havendo uma grande variabilidade de respostas. Este fenómeno ocorre devido a mecanismos de resistência primária, como alterações do microambiente tumoral, assinaturas de resistência inapta anti-PD1 e factores intrínsecos tumorais; e de resistência adquirida, como a evolução dos neoantígenos tumorais, mutações do JAK1/JAK2, mutações da β_2 -microglobulina e estabilidade epigenética de células T “exaustas”. Dada esta diversidade moleculo-celular, é imperativo a determinação de biomarcadores que permitam uma selecção de pacientes, para um tratamento cada vez mais eficiente, personalizado e individualizado. O primeiro a ser estudado foi o PDL-1, sendo que, até hoje, não se encontrou uma correlação linear que permitisse prever a resposta a esta terapêutica, havendo uma necessidade de *standardizar* a determinação da sua expressão, nos diversos estudos. Actualmente, já se procede à detecção e avaliação de células PDL-1 positivas nos tecidos tumorais, através de testes imuno-histoquímicos, como o “VENTANA PDL-1 (SP142)” e o “PDL-1 22C3 pharmDx”, sendo este último o mais recente. O aumento do conhecimento das assinaturas genómicas do cancro é, também, um passo para a individualização de cada doente, apesar das terapias dirigidas ainda serem bastante limitadas. Actualmente, inúmeros estudos estão em curso no sentido de investigar o papel da imunoterapia, tanto nos cancros uroteliais não músculo-invasivos, como também nos músculo-invasivos localmente avançados e/ou metastizados, como adjuvância e/ou neoadjuvância.

Palavras-chave: Imunoterapia; Cancro da Bexiga; PDL-1; Urotelial; IHQ

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

LISTA DE ABREVIATURAS

NMIBC - Non-muscle-invasive bladder cancer

MIBC - Muscle-invasive bladder cancer

CTLA-4 - Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

PD-1 - Programmed death-1

PDL-1(2) - Programmed death-ligand 1(2)

BCG - Bacillus Calmette-Guérin

FDA - Food and Drug Administration

JAK1(2) - Janus Kinase 1(2)

CK - Cytokeratin

HER-2 - Human Epidermal growth factor Receptor 2

CD - Cluster of differentiation

CIS - Carcinoma in situ

MDSC - Myeloid-derived suppressor cell

APC - Antigen-presenting cell

MHC - Major histocompatibility complex

IgG - Immunoglobulin G

ORR - Overall response rate

OS - Overall survival

PFS - Progression-free survival

IFN- γ - Interferon gamma

TIL - Tumour-infiltrating lymphocytes

TIME - Tumour immune microenvironment

VISTA - V-Type Immunoglobulin Domain-Containing Suppressor of T-cell Activation

LAG3 - Lymphocyte-activation gene 3

BTLA - B and T lymphocyte attenuator

CXCL - Chemokine (C-X-C motif) ligand

IDO - Indoleamine 2,3-dioxygenase

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

IPRES - Innate anti-PD1 resistance

VEGF - Vascular endothelial growth factor

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

PI3K-AKT - Phosphatidylinositol 3 kinase – Threonine Kinase

TCR - T cell receptor

IHQ - Immunohistochemistry

H&E - Hematoxylin and eosin

FGFR - Fibroblast growth factor receptor

RB - Retinoblastoma

PPARG - Peroxisome proliferator-activated receptor gene

CPS – Combined Positive Score

ÍNDICE

ABSTRACT	3
RESUMO	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
ÍNDICE.....	9
INTRODUÇÃO	10
TRABALHO DE REVISÃO.....	12
1. Cancro da bexiga	12
1.1. Classificação dos tumores do urotélio	13
2. Imunoterapia.....	23
2.1. BCG	24
2.2. Evasão ao sistema imunitário.....	24
3. Inibidores Anti PD-1/PDL-1	25
3.1. Atezolizumab.....	26
3.2. Pembrolizumab	29
3.3. Durvalumab.....	30
3.4. Avelumab	31
3.5. Nivolumab	32
4. Imunoterapia e Químio-Radioterapia	33
4.1. Quimioterapia e Radioterapia	34
5. Efeitos adversos	35
6. Resistência aos inibidores de <i>checkpoint</i> imunitários.....	36
6.1. Resistência primária	36
6.2. Resistência adquirida	40
7. Biomarcadores	42
7.1. PDL-1	42
7.2. Perfis de expressão genética.....	45
AGRADECIMENTOS.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	49

INTRODUÇÃO

O carcinoma urotelial é o cancro mais comum do sistema urinário em todo o mundo. A maioria dos tumores uroteliais surge na bexiga, com os restantes tendo origem na pélvis renal, ureter e uretra proximal.¹ O cancro urotelial da bexiga é dos cancros mais letais do mundo, causando mais de 130 000 mortes por ano.² Apesar da maioria dos pacientes se apresentar com doença não músculo-invasiva, aproximadamente 30-40% apresenta doença músculo-invasiva, localmente avançada e/ou metastizada, com uma sobrevida aos 5 anos de 15%, na qual a terapêutica *standard* corresponde à cistectomia radical, com ou sem a utilização de radioterapia fraccionada e/ou quimioterapia baseada na cisplatina.¹ As células tumorais, para se protegerem, apresentam uma diversidade de mecanismos e estratégias, de forma a suprimir e evadir o sistema imunitário, correspondendo esta capacidade a um dos marcos do desenvolvimento cancerígeno.¹⁴ De facto, o cancro da bexiga é um dos que maior taxa mutacional apresenta, e essa grande imunogenicidade é comprovada na resposta positiva à utilização de BCG como terapia adjuvante, no cancro da bexiga não músculo-invasiva.¹² Na verdade, o sistema imunitário tem tido um papel cada vez mais importante no conhecimento da sobrevivência e desenvolvimento tumoral. Apesar dos avanços no tratamento e sobrevida nas últimas três décadas, os regimes terapêuticos para o cancro urotelial localmente avançado e/ou metastizado mantiveram-se inalterados, até à emergência dos inibidores de *checkpoint* imunitários, como o CTLA-4 e o PD-1/PDL-1.¹⁸ Estes *checkpoints* correspondem a sinais moleculo-celulares, capazes de parar uma resposta imunitária, sendo cruciais para a manutenção da auto-tolerância e para a modulação da duração e intensidade das respostas imunitárias fisiológicas, minimizando os danos colaterais nos tecidos saudáveis. A interação PDL-1 (*programmed death ligand-1*) / PD-1 (*programmed death-1*) é um desses mecanismos reguladores da actividade das células T. O PDL-1 é, frequentemente, sobre-expresso nas células tumorais e, ligando-se ao PD-1 localizado nas células T, cria um sinal de inibição da sua proliferação, produção de citocinas e actividade citolítica, resultando em uma evasão imunitária. A inibição da ligação PDL-1/PD-1 reverte essa inibição, permitindo uma resposta citotóxica mais forte e eficaz e, consequentemente, à morte das células tumorais.¹⁹ Assim, recentemente, foi descoberta uma nova classe de anticorpos monoclonais, os anti-PD1 e os anti-PDL1, apresentando uma boa tolerância e eficácia oncológica, incluindo o prolongamento da sobrevida global destes doentes. Os anticorpos anti-PDL1 incluem o Atezolizumab, o Durvalumab e o Avelumab, enquanto os

anticorpos anti-PD1 correspondem ao Pembrolizumab e ao Nivolumab, todos eles aprovados pelo FDA para terapêutica de 2ª linha no cancro urotelial localmente avançado e/ou metastizado. O Atezolizumab e o Pembrolizumab fazem parte, também, da 1ª linha de tratamento para estes pacientes, que sejam inelegíveis à quimioterapia baseada na cisplatina.¹⁹ De facto, a descoberta destas novas terapêuticas é fundamental, uma vez que, para além de que mais de 50% dos pacientes não se encontrem elegíveis para a quimioterapia, a falta de alternativas terapêuticas face à alta taxa de recorrência e progressão da doença sempre foi uma realidade.³³

No entanto, nem todos os pacientes respondem de igual modo à imunoterapia. Na verdade, existe um conjunto de alterações genéticas, moleculocelulares e do microambiente tumoral que permite ao tumor resistir à imunoterapia.³⁸

Um dos grandes desafios é perceber quais os mecanismos de acção dos inibidores de *checkpoint* imunitários, a nível molecular, de forma a podermos adquirir a capacidade de melhor prever e, potencialmente, aumentar a sua eficácia clínica. Desta forma, a descoberta de marcadores de diagnóstico, aliado ao conhecimento das resistências tumorais, permitirá a sua classificação em diversos subgrupos e, desse modo, maximizar os benefícios desta terapêutica, numa abordagem cada vez mais individualizada e personalizada.⁴⁶

O carcinoma urotelial apresenta-se como uma doença heterogênea com duas entidades clínico-patológicas bem distintas: não músculo-invasivo (**NMIBC**) e músculo-invasivo (**MIBC**). No momento do diagnóstico, aproximadamente 75% dos doentes apresentam-se como NMIBC, tumores superficiais. Os restantes 25% correspondem a MBIC, podendo estar associados, ou não, a disseminação de gânglios linfáticos e/ou metástases à distância. No entanto, existem mecanismos *overlapping* encontrados em alguns tumores superficiais de alto grau, progredindo eventualmente para uma doença agressiva e invasiva. De acordo com a arquitetura celular e atipia citológica, são subdivididos em tumores de baixo grau e de alto grau.⁵

1.1. Classificação dos tumores do urotélio

Através do **Sistema TNM**, estes tumores são classificados em quatro estádios (*I a IV*), sendo que diferentes estádios apresentam diferentes opções terapêuticas e diferentes prognósticos. O “**T**” corresponde ao tumor primário: T₀ (sem evidência de tumor primário), T_a (carcinoma papilar não-invasivo), T_{is} (carcinoma in situ), T₁ (invasão do tecido subepitelial), T_{2a} (invasão da *muscularis propria* superficial), T_{2b} (invasão da *muscularis propria* profunda), T_{3a} (invasão do tecido perivesical, microscopicamente), T_{3b} (invasão do tecido perivesical macroscopicamente), T_{4a} (invasão do estroma prostático, vesículas seminais, útero ou vagina), T_{4b} (invasão da parede pélvica ou abdominal). O “**N**” corresponde aos gânglios linfáticos regionais: N₀ (sem metástases dos gânglios linfáticos regionais), N₁ (metástases em um único gânglio linfático na pelve verdadeira: hipogástrico, obturador, ilíaco externo ou pré-sagrado), N₂ (metástases em múltiplos gânglios linfáticos na pelve verdadeira: hipogástrico, obturador, ilíaco externo ou pré-sagrado), N₃ (metástases nos gânglios linfáticos da ilíaca comum). Por fim, o “**M**” corresponde a metástases à distância: M₀ (sem metástases à distância), M₁ (com metástases à distância). (*figura 3*)

Category T: Primary tumour (T)	
TX: Primary tumour cannot be assessed	
T0: No evidence of primary tumour	
Tis: Carcinoma in situ: "flat tumour"	
Ta: Non-invasive papillary carcinoma	
T1: Tumour invades subepithelial connective tissue	
T2: Tumour invades muscular layer	
T2a: Tumour invades superficial muscular layer	
T2b: Tumour invades deep muscular layer	
T3: Tumour invades perivesical fat	
T3a: Microscopically	
T3b: Macroscopically	
T4: Tumour invades any of the following structures: prostate, uterus, vagina, pelvic wall, or abdominal wall	
T4a: Tumour invades prostate, uterus, or vagina	
T4b: Tumour invades pelvic or abdominal wall	
Category N: Lymph node involvement (N)	
Nx: Regional lymph nodes cannot be assessed	
N0: Regional lymph node metastases are not demonstrated	
N1: Metastasis in a single lymph node, maximum diameter ≤ 2 cm	
N2: Metastasis in a single lymph node, maximum diameter > 2 cm, but ≤ 5 cm or in various lymph nodes, none of them > 5 cm of maximum diameter	
N3: Metastasis in a single lymph node, maximum diameter > 5 cm	
Category M: Metastasis (M)	
Mx: Distant metastases cannot be assessed	
M0: No distant metastases	
M1: Distant Metastasis	

Stage grouping			
Stage 0a	Ta	N0	M0
Stage 0is	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2a-b	N0	M0
Stage III	T3a-b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Stage IV	T4b	N0	M0
	Any T	N1-3	M0
	Any T	Any N	M1

Figura 3. Classificação TNM do carcinoma da bexiga.²

De acordo com estas informações, os tumores são agrupados em vários estádios: **estádio 0a** (Ta, N0, M0); **estádio 0is** (Tis, N0, M0); **estádio I** (T1, N0, M0); **estádio II** (T2, N0, M0); **estádio III** (T3, N0, M0 ou T4a, N0, M0); **estádio IV** (T4b, N0, M0 ou qualquer T, N1-3, M0 ou qualquer T, qualquer N, M1).⁴ (figura 4)

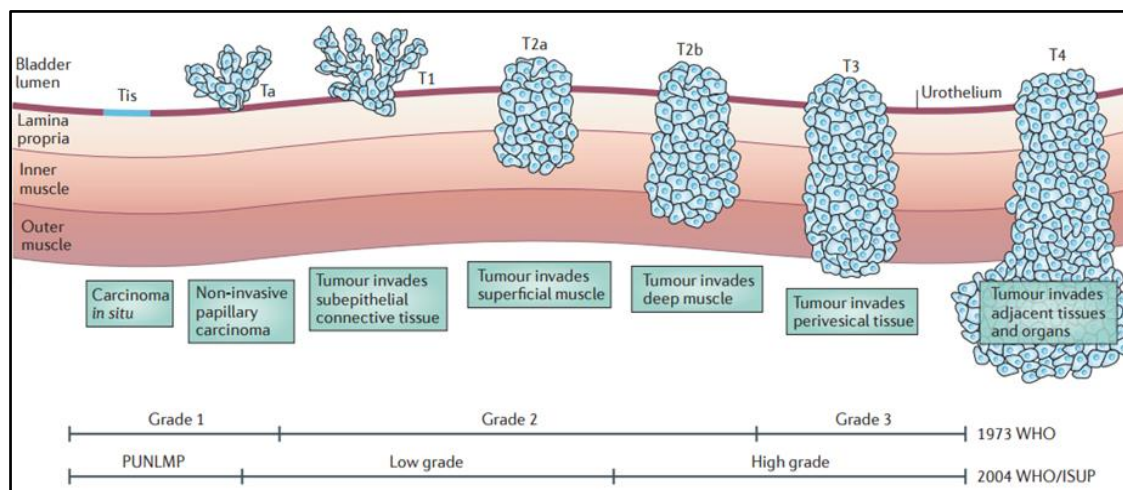


Figura 4. Estadiamento do cancro urotelial da bexiga.¹³

1.1.1. Tumores MIBC

O tumor MIBC é também designado de carcinoma urotelial infiltrativo. A sua etiologia é multifactorial, podendo estar associado a **síndromes hereditárias** como o Síndrome de

Lynch, Retinoblastoma Hereditário ou Síndrome de *Costello*; a **factores ambientais**, através da exposição a uma enorme variedade de compostos químicos (p.e. aminas aromáticas); ao fumo do tabaco, estando o risco positivamente correlacionado com a sua duração e intensidade; a exposições ocupacionais (p.e. pintores, condutores de viaturas e trabalhadores industriais) tendo um efeito sinérgico com o fumo do tabaco; a radioterapia e/ou a infecção por *Schistosoma*.⁴ No que diz respeito aos sintomas, a sua gravidade depende do estadio tumoral. O sintoma mais comum é a **hematúria**, seguida de urgência miccional, noctúria e disúria.⁶ Numa apresentação tardia, a massa tumoral poderá causar sintomas de obstrução urinária; o doente poderá, ainda, apresentar outro tipo de sintomatologia, relacionado com a possível existência de metástases, nomeadamente hepáticas, pulmonares e ósseas, sendo estas as mais comuns.³ A cistoscopia, o exame bimanual sob anestesia e a biópsia/ressecção transuretral são as técnicas de diagnóstico e estadiamento dos carcinomas da bexiga mais utilizadas. A identificação radiográfica das metástases ganglionares é importante, sendo que a TC e a RM apresentam sensibilidades semelhantes, no entanto, inferiores ao PET. Contudo, o aumento de dimensões de um gânglio linfático é um factor preditivo muito forte de doença metastática, pelo que deverá ser realizada biópsia guiada por TC para a sua confirmação. Para a detecção de metástases à distância, a TC tóraco-abdomino-pélvica, a cintigrafia do esqueleto e a TC crânio-encefálica são cruciais.⁵ (figura 5)

Recommendation	GR
<i>Assessment of tumour specimens</i>	
Record the depth of invasion (categories pT2a, pT2b, pT3a, pT3b, or pT4).	A*
Margins with special attention paid to the radial margin, prostate, ureter, urethra and peritoneal fat, and uterus and vaginal top.	
Record the number of lymph nodes and number of positive lymph nodes.	
Record lymphatic or blood vessel invasion.	
Record the presence of carcinoma in situ.	
<i>Primary assessment of presumed invasive bladder tumours</i>	
Cystoscopy should describe all macroscopic features of the tumour (site, size, number, and appearance) and mucosal abnormalities.	C
A bladder diagram is recommended.	
Take a biopsy of the prostatic urethra for cases of bladder neck tumour, when bladder carcinoma in situ is present or suspected, when there is positive cytology without evidence of tumour in the bladder, or when abnormalities of the prostatic urethra are visible.	
In women undergoing subsequent orthotopic neobladder construction, obtain procedural information (including histologic evaluation) of the bladder neck and urethral margin, either prior to or at the time of cystectomy.	C
<i>Staging in MIBC</i>	
In patients with confirmed MIBC, use CT of the chest, abdomen, and pelvis as the optimal form of staging. Include excretory-phase CT urography for optimum examination of the upper urinary tract.	B
Diagnose UTUC using excretory-phase CT urography rather than MR urography because excretory-phase CT urography has greater diagnostic accuracy and is associated with less cost and greater patient acceptability.	C
Use MR urography when CT urography is contraindicated for reasons related to contrast administration or radiation dose.	C
Perform endoscopically guided biopsy for histopathologic confirmation of preoperative diagnosis of upper urinary tract urothelial carcinoma.	C
Use CT or MRI for staging locally advanced or metastatic disease in patients in whom radical treatment is considered.	B
Use CT to diagnose pulmonary metastases. CT and MRI are generally equivalent for diagnosing local disease and distant metastases in the abdomen.	C
CT = computed tomography; GR = grade of recommendation; MIBC = muscle-invasive bladder cancer; MRI = magnetic resonance imaging; UTUC = upper urinary urothelial carcinoma.	

Figura 5. Recomendações para diagnóstico e estadiamento do cancro urotelial da bexiga.⁶

O passo inicial para o estadiamento do tumor da bexiga é a **cistoscopia**, seguida de **biópsia ou ressecção transuretral**, para confirmação do diagnóstico histológico e determinação da extensão da doença. Adicionalmente ao estadiamento TNM, o tumor é classificado de acordo com a sua variante histológica específica, tendo implicações prognósticas e terapêuticas importantes.⁶ O carcinoma urotelial infiltrativo pode apresentar uma ampla variedade de **padrões de arquitectura**. Nos grandes nichos, as células tumorais podem apresentar uma arquitectura estratificada, com os núcleos perpendiculares à membrana basal e com alguma maturação em direcção ao centro da estrutura do urotélio. Na verdade, na maioria dos tumores, não há características que se assemelhem ao urotélio normal. A presença do padrão em células isoladas e em “forma de cordão” está associado a um pior prognóstico. A grande maioria dos carcinomas uroteliais infiltrativos são de alto grau, apresentando um marcado pleomorfismo nuclear, com grande variabilidade do tamanho e forma da hipercromatina. Os contornos nucleares são irregulares e, muitas vezes, apresentam os cantos agudos. As mitoses são numerosas e figuras mitóticas atípicas estão presentes. O citoplasma eosinofílico é normalmente moderado ou abundante. O carcinoma urotelial invasivo elicitava uma resposta estromal, tornando o estroma reactivo. Pode, também, ocorrer uma resposta inflamatória linfoplasmocítica, havendo dados que sugerem que a presença de resposta inflamatória é indicativa de um prognóstico mais favorável. A **imuno-histoquímica** é um importante adjunto do diagnóstico, sendo baseado nas diferenças da expressão molecular dos tumores de baixo e de alto grau. Os marcadores mais específicos para a diferenciação urotelial são a **Uroplaquina II** e **Uroplaquina III**, apesar das suas baixas sensibilidades (70% e 40%, respectivamente). O marcador **GATA-3** é expresso em 67-90% dos carcinomas uroteliais, apesar da sua expressão ocorrer também em outro tipo de tumores, nomeadamente da mama, tendo, deste modo, importância na selecção de diagnósticos diferenciais. O carcinoma urotelial expressa, na sua grande maioria, **CK7** e **CK20**; no entanto, 14% dos tumores de alto grau não expressam nem CK7 nem CK20. As citoqueratinas de alto peso molecular (**34Be12** e **CK5/6**) são de grande importância, uma vez que são expressas numa grande proporção dos tumores de alto grau. A proteína **P63** e **S100P** são, também, marcadores úteis no diagnóstico diferencial. No que diz respeito às variantes histológicas (*figura 6*) dos carcinomas uroteliais, estes podem ser designados:

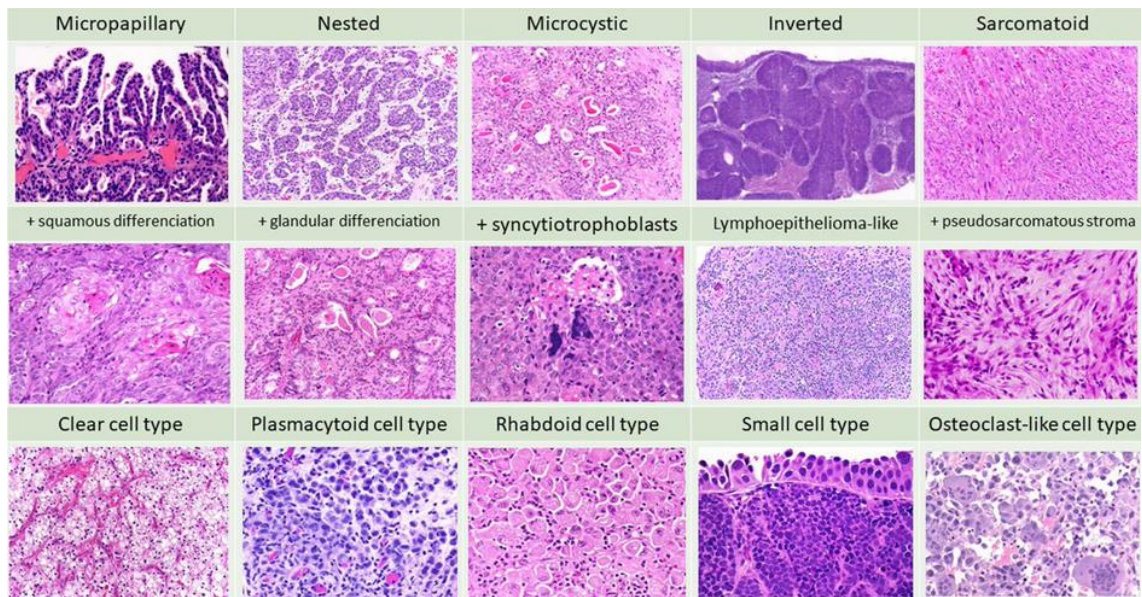


Figura 6. Variantes histológicas dos tumores MIBC.¹

1. Em nichos: proliferação desordenada de pequenos aglomerados de nichos sob o urotélio, com uma irregularidade da interface tumor-estroma, núcleos com pouca ou nenhuma atipia e figuras mitóticas ocasionais; imuno-histoquímica limitada, com perfil de expressão similar ao carcinoma urotelial usual, com a expressão de GATA-3, 34Be12, P63, CK7 e CK20; marcadores como Ki-67 e p53 podem ser usados para estabelecer o diagnóstico; tem pior prognóstico que os carcinomas uroteliais usuais, uma vez que apresentam um crescimento amplamente infiltrativo, apesar de pouca atipia.

2. Microquística: forma aparentemente benigna (podendo ser confundido com cistite quística ou cistite glandular), mas que apresenta, muitas vezes, alto grau; presença de microquistos predominantemente redondos ou ovais, delineado por um epitélio brando, podendo invadir o músculo detrusor; secreções intraluminais e calcificações podem existir, sendo que a resposta do estroma é fraca; expressa GATA-3, S100P, CK7, CK20, p63 e citoqueratinas;

3. Micropapilar: tumores de alto grau e comportamento agressivo, predominantemente no sexo masculino e na 6ª década de vida, apresentam pequenos agregados de nichos, muitas vezes rodeados por lacunas, assemelhando-se a invasão vascular; tumores de alto grau com núcleos atípicos, vacúolos citoplasmáticos com distorção dos contornos nucleares e invasão linfovascular; carcinoma *in situ* presente em mais de 50% dos casos; expressão de GATA-3, S100P, Uroplaquina II, trombomodulina, CK7, CK20, p63 e

Citoqueratinas; a sobre-expressão de ERBB2 (HER2) é mais comum do que no carcinoma urotelial convencional; associado a um elevado risco de mortalidade;

4. Linfoepitelioma-like: assemelha-se a linfoepitelioma da nasofaringe, podendo ser confundido com um processo linfoproliferativo ou cistite crónica; presença de nichos e cordões de células indiferenciadas com núcleos pleomórficos, nucléolos proeminentes, bordos citoplasmáticos indistinguíveis e aparência sincicial; infiltrado linfóide que inclui linfócitos B e T, histiócitos, neutrófilos e eosinófilos; expressão de citoqueratinas, p63 e GATA-3; prognóstico favorável, podendo responder a quimioterapia;

5. Plasmocitóide: assemelha-se a células do plasma e/ou monócitos; presença de células malignas isoladas, com um citoplasma eosinófilo, núcleo hipercromático centrado com pequenos nucléolos, num estroma mixóide; componente de carcinoma de alto grau em 50% dos casos; expressão de citoqueratinas, p63, GATA-3 e Uroplaquinas II e III; positivos para CD138 e a maioria não expressa a E-caderina; mau prognóstico, com altas taxas de recorrência e mortalidade, devido a um alto risco de invasão do tecido perivesical e peritoneal;

6. Células gigantes: presença de células gigantes pleomórficas, similar às células gigantes do tumor do pulmão; é comum a presença de figuras mitóticas típicas ou atípicas, invasão da *muscularis propria*, e necrose extensa; mau prognóstico;

7. Rico em lípidos: presença de lipoblastos-like, com vacúolos citoplasmáticos lipídicos, em volta do núcleo; carcinoma de alto grau, com mau prognóstico (60% de mortalidade nos 58 meses);

8. Células claras: presença de células com citoplasma rico em glicogéneo, normalmente associado a carcinoma *in situ* ou papilar; expressão de GATA-3, S100P, p63, trombomodulina, CK7 e CK20; prognóstico ainda desconhecido devido à sua raridade;

9. Sarcomatóide: características histológicas indistinguíveis de um sarcoma, com áreas sarcomatosas misturadas com células pequenas, glandulares e escamosas; predominantemente no sexo masculino e na 6ª década de vida, sendo a radiação e a ciclofosfamida dois factores de risco típicos; o componente sarcomatóide consiste em células pleomórficas de alto grau; os componentes heterólogos (pior prognóstico) incluem osteosarcoma, condrosarcoma, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma e angiosarcoma;

expressão de citoqueratinas, p63, GATA-3 e Vimentina (80%); metástases ganglionares e viscerais estão muitas vezes presentes, sendo a taxa de sobrevivência aos 5 anos de 20%.¹

No que diz respeito à terapêutica, a **cistectomia radical**, incluindo a dissecação dos gânglios linfáticos pélvicos, mantém-se como tratamento *standard*, sendo que a quimioterapia sistêmica, associada ou não a radioterapia, a imunoterapia, e cuidados de suporte paliativos apresentam um papel importante nestes estádios.³

A quimioterapia de combinação baseada na cisplatina faz parte do tratamento de primeira linha para pacientes com **carcinoma urotelial metastizado**, com uma sobrevida global de 9-15 meses e uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 15%.⁷ (figura 7)

Table 8 – Recommendations for metastatic disease

Recommendation	GR
First-line treatment for fit patients	
Use cisplatin-containing combination chemotherapy with GC, PCG, MVAC, preferably with G-CSF, or HD-MVAC with G-CSF.	A
Do not use carboplatin and nonplatinum combination chemotherapy.	B
First-line treatment in patients ineligible (unfit) for cisplatin	
Use carboplatin combination chemotherapy or single agents.	C
For cisplatin-ineligible (unfit) patients, with PS 2 or impaired renal function, as well as those with 0 or 1 poor Bajorin prognostic factors and impaired renal function, offer carboplatin-containing combination chemotherapy, preferably with gemcitabine/carboplatin.	B
Second-line treatment	
Offer vinflunine to patients progressing after platinum-based combination chemotherapy for metastatic disease. Alternatively, offer treatment within a clinical trial setting.	A*
Offer zoledronic acid or denosumab to treat bone metastases.	B
GC = gemcitabine with cisplatin; G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; GR = grade of recommendation; HD-MVAC = high-dose intensity methotrexate, vinblastine, Adriamycin, and cisplatin; MVAC = methotrexate, vinblastine, Adriamycin, and cisplatin; PCG = paclitaxel, cisplatin, and gemcitabine; PS 2 = performance status 2.	
* Grade A recommendation is weakened by a problem of statistical significance.	

Figura 7. Recomendações para o tratamento do cancro urotelial da bexiga metastático.⁶

1.1.2. Tumores NMIBC

Os tumores NMIBC, que correspondem a lesões superficiais, podem ser separados em duas categorias: **papilares** ou **planos**, podendo este último exibir um largo espectro de atipia, desde benigna e pre-neoplásica a francamente maligna (carcinoma *in situ*). Estas duas categorias podem encontrar-se separadas ou em combinação. (figura 8) Mantém-se uma controvérsia no que diz respeito a esta classificação, uma vez que os riscos de recorrência e progressão não são determinados de uma forma clara pelo padrão de crescimento e estadio, mas também por múltiplos outros factores, nomeadamente o tamanho, o tempo de recorrência e a realização de terapia intravesical *à priori*.⁸

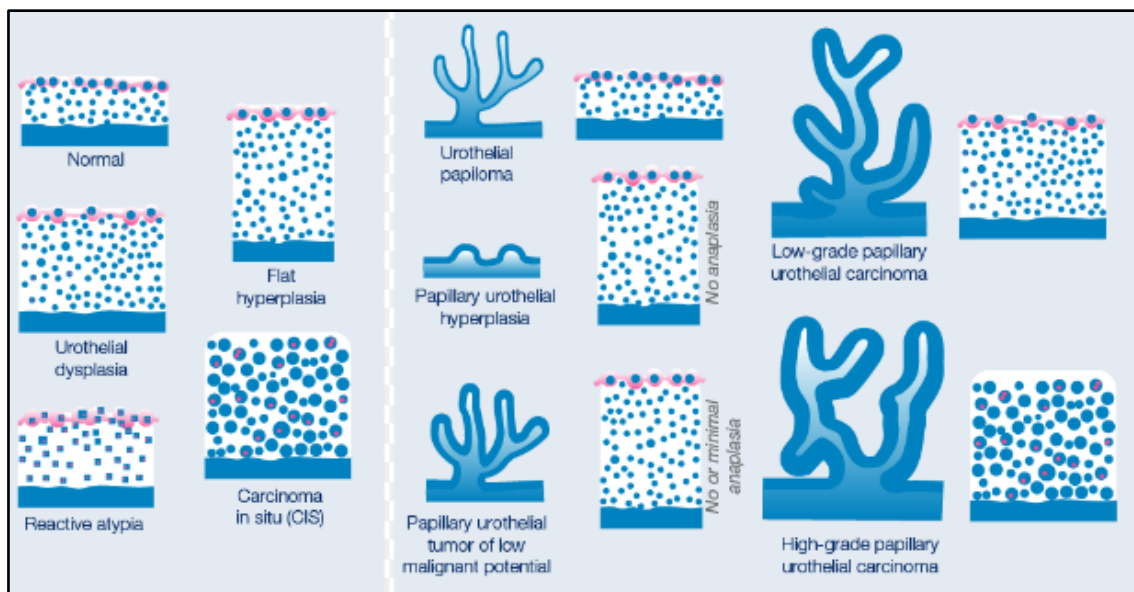


Figura 8. Variantes histológicas dos tumores NMIBC.¹

No que diz respeito ao **Carcinoma *in situ***, este corresponde a uma lesão urotelial plana, de espessura variável, desprovido de estruturas papilares, contendo células malignas. É muito frequente encontrar-se adjacente ou subsequente a carcinomas uroteliais papilares de alto grau e em 45-65% dos tumores invasivos. Macroscopicamente, pode ser difícil ser identificado, uma vez que pode apresentar áreas de eritema focais, multifocais ou difusas. Relativamente à sua histopatologia, é caracterizado pela presença de células com núcleo hiper cromático e pleomórfico, com um ou mais nucléolos irregulares, ocupando toda a espessura do urotélio. As mitoses normalmente são abundantes, com formas atípicas ocasionais, e a lâmina própria encontra-se normalmente inflamada. Algumas células têm um citoplasma eosinofílico abundante. Não existe evidência de que a imunohistoquímica permita diferenciar carcinoma *in situ* de displasia urotelial. O CD44 está presente no urotélio normal, ao contrário da maioria dos casos de C_{is}, que apresenta uma elevada taxa de proliferação medida pelo Ki-67, e a expressão da proteína p53. Um número significativo de doentes, apesar de responderem à instilação intravesical de BCG, acabam por recorrer, e em 25% dos casos progredir para doença invasiva. A fraca resposta à terapia intravesical está associada à progressão da doença, sendo indicação para cistectomia.

O **Carcinoma Papilar Não Invasivo** encontra-se normalmente localizado nas paredes posterior e laterais da bexiga, apresentando lesões exofíticas isoladas ou múltiplas, com uma grande variação de tamanho. Aproximadamente 70-75% dos carcinomas uroteliais

são não-invasivos e papilares, com predominância no sexo masculino (*ratio* 3:1) e a média de idade é de 70 anos. Mais de 50% destes tumores são de baixo risco e, apesar do elevado risco de recorrência, menos de 15% desenvolve doença invasiva. A sua forma histopatológica é definida por uma fina camada fibrovascular coberta por um urotélio neoplásico de espessura variável, apresentando uma desordem na citologia e na arquitetura histológica. A heterogeneidade do estadio é uma característica de carcinoma papilar, podendo ser de baixo ou de alto grau. Os de baixo grau, apresentam papilas delicadas com extensas ramificações, uma relativa ordem da arquitetura e com pouca presença de pleomorfismo nuclear e mitoses. As taxas de recorrência e progressão são de 50% e 10%, respectivamente. Os de alto grau, as papilas são fundidas, conferindo uma aparência exofítica mais sólida, e apresentam desordem celular, pleomorfismo e irregularidade nucleares, nucléolos proeminentes e numerosas mitoses, incluindo formas irregulares e típicas; estes expressam GATA-3, CK20, p63, CK5/6 e citoqueratinas. A taxa de recorrência é de 60%, de progressão para a lâmina própria de 25%, e de invasão da *muscularis propria* de 5%.

A **Neoplasia Urotelial Papilar de Baixo Potencial Maligno** é um neoplasia urotelial papilar com atipia mínima, apresentando lesões papilares exofíticas discretas, isoladas ou múltiplas. Apresenta um urotélio mais espesso e mais celular que o normal, com ausência de anormalidades da arquitetura histológica. Comparativamente ao carcinoma urotelial de baixo grau, a neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno apresentou *outcomes* mais favoráveis, no que diz respeito às taxas de recorrência e progressão.

O **Papiloma Urotelial** é uma neoplasia normalmente localizada no trígono, caracterizado por uma camada fibrovascular delicada limitada por um urotélio de aparência e espessura normal. Muitos deles ocorrem em pacientes com menos de 50 anos de idade, incluindo crianças e adultos jovens. Estas neoplasias têm um padrão hierárquico de ramificação papilar, com um mínimo de confluência entre as papilas. O urotélio não é espessado e apresenta uma citologia normal. Expressa CK20 e os baixos valores de Ki-67 demonstram uma baixa taxa de proliferação (menos de 5%). A taxa de recorrência é de 8-14% e de progressão é de menos de 1%. O tratamento corresponde a ressecção transuretral completa.

O **Papiloma Urotelial Invertido** é uma neoplasia com um padrão de crescimento complexo, anastomosante e invertido, com ausência de atipia citológica, normalmente localizado no colo da bexiga, seguido do trígono, parede lateral e parede posterior, caracterizado por lesões polipóides e pedunculadas, com interfaces suaves com o estroma subjacente. Apresentam um padrão de crescimento trabecular, relativamente uniforme, invaginando em direcção à lâmina própria, por vezes associado a alterações quísticas e vacuolização de células luminas. Quistos colóides (espaços com material eosinofílico no urotélio) são muitas vezes observados na porção central das trabéculas, sendo delineadas por células secretoras de mucina. O estroma interveniente é mínimo e normalmente fibrótico, com o mínimo de inflamação. A taxa de recorrência é de menos de 2%.

A **Proliferação Urotelial de Potencial Maligno Incerto** apresenta um espessamento marcado do urotélio, com o mínimo de atipia citológica e sem formação de papilas, verdadeiramente. A lesão é tipicamente focal e elevada, podendo ser isolada ou adjacente a neoplasias uroteliais papilares de baixo grau. O urotélio espessado, de grande densidade celular, é constituído por dobras mucosas ondulatórias estreitas de diferentes alturas e, contrariamente às neoplasias papilares, não apresentam papilas bem definidas com o tecido fibrovascular. Dois terços dos pacientes têm uma história de anterior, concorrente ou subsequente, neoplasia urotelial, podendo corresponder a uma manifestação precoce dessa mesma neoplasia. O risco de desenvolver neoplasia urotelial, em 5 anos, é de quase 40%.

Por fim, a **Displasia Urotelial** apresenta características de arquitectura e citologia pre-neoplásicas, não sendo tão linear nos casos de carcinoma *in situ*. É geralmente assumido que apresenta os mesmos factores predisponentes que o carcinoma *in situ* e, clinicamente, muitas vezes é silencioso. Macroscopicamente, o eritema encontra-se presente, e em termos histopatológicos, é a categoria mais difícil de definir devido à variabilidade entre os observadores, devendo ser distinguida do urotélio normal e do urotélio com atipia de significado desconhecido. Ocorre perda do arranjo perpendicular das células uroteliais, com um mínimo grau de alargamento ou irregularidade nuclear, normalmente com ausência de inflamação. A presença de pleomorfismo nuclear, tamanho nuclear maior que cinco a seis linfócitos e grande actividade mitótica é a favor do carcinoma *in situ*. Comparativamente com o urotélio normal, a displasia urotelial apresenta uma maior imunoreactividade para o CK20, o Ki-67 é tipicamente maior que 50% e a expressão de

p53 é também mais comum. A morfologia permanece o *gold standard* para o diagnóstico.¹

No que diz respeito à terapêutica, a **ressecção transuretral** corresponde ao tratamento *standard*, sendo que a quimioterapia intravesical e imunoterapia com BCG apresentam um papel importante nestes estádios. (figura 9)

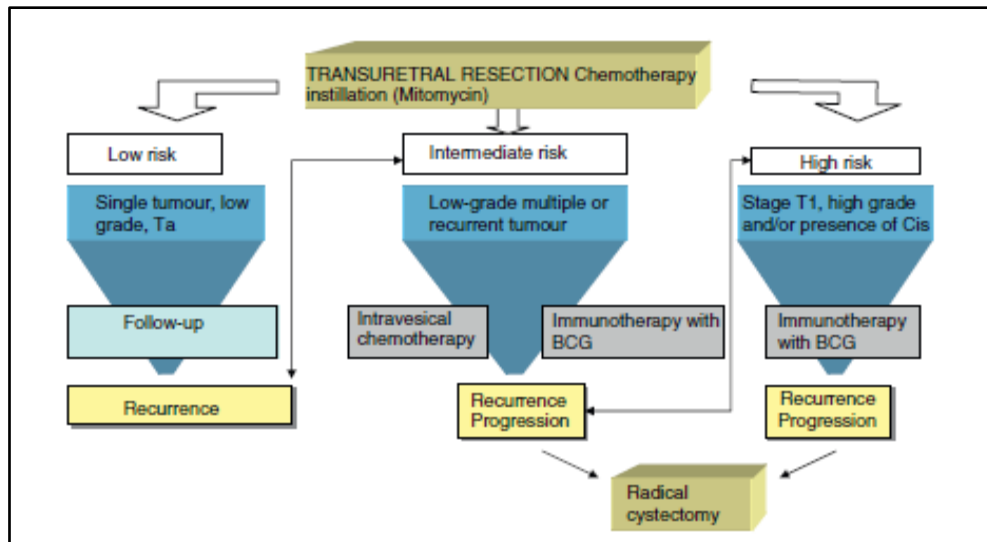


Figura 9. Algoritmo terapêutico na abordagem ao cancro da bexiga.²

Estes tumores apresentam, na sua globalidade, uma recorrência de 30-80% e uma progressão de grau e estágio de 30%. De facto, a recorrência e progressão correspondem aos factores de prognóstico mais importantes deste tipo de tumores.³

2. Imunoterapia

A imunoterapia corresponde a uma nova era no tratamento oncológico. Ao contrário da quimioterapia, que tem como alvo directo as células tumorais, a imunoterapia procura estimular o sistema imunitário a actuar contra essas mesmas células. É caracterizada por conduzir a respostas significativas e duradouras, apesar do maior tempo ocorrido até o seu efeito ser observado.⁹ Após décadas de estagnação terapêutica neste campo, estudos realizados com a utilização de inibidores anti-PD1/PDL1 têm demonstrado resultados bastante promissores em pacientes com cancro urotelial localmente avançado e/ou

metastizado, não elegíveis ou resistentes à quimioterapia.¹⁰ A par do cancro do pulmão e do melanoma, o cancro da bexiga apresenta uma das maiores taxas mutacionais, sugerindo que, apesar da variabilidade em termos moleculo-celulares, estes pacientes sejam responsivos aos inibidores de *checkpoint* inibitórios.¹¹

2.1. BCG

A importância da imunoterapia foi primeiramente estabelecida em 1976 quando Moralis et al. provaram que fazer instilações intravesicais do *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) apresenta eficácia na prevenção de recorrências dos NMIBC de alto risco, com uma redução do risco de recorrência em cerca de 30%. O BCG corresponde a uma cadeia atenuada de *Mycobacterium bovis*, tendo sido desenvolvida como vacina contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de décadas de estudo, os seus mecanismos de acção ainda não se encontram completamente conhecidos.¹²

Actualmente, o tratamento intra-vesical com BCG está indicado para o cancro da bexiga superficial, em doentes com tumores de alto risco de recorrência e/ou progressão, tendo a capacidade de penetrar no músculo detrusor, induzindo uma resposta imunitária citotóxica, que persiste por longos períodos de tempo. Contudo, 30% dos pacientes falha na resposta inicial e, entre os que respondem, eventualmente 74% apresentará recorrência.¹³

2.2. Evasão ao sistema imunitário

A evasão ao sistema imunitário é um passo fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral. Esta é conseguida através de vários mecanismos como a diminuição de antígenos reconhecidos pelas células T, o recrutamento para o microambiente tumoral de células imunossupressoras como as MDSCs (células supressoras mielóides), células T reguladoras e macrófagos do tipo M2, e uma regulação positiva dos *checkpoints* imunitários, que correspondem a sinalizações inibitórias que modulam a duração e amplitude de respostas imunitárias.¹⁴ A activação das células T requer dois sinais: o primeiro, corresponde à apresentação por parte das APCs (células apresentadoras de antígenos) às células T de antígenos pépticos, como moléculas tumorais, ligados ao complexo major de histocompatibilidade (MHC); o segundo, requer um sinal co-estimulatório, sendo dos mais conhecidos e estudados o mecanismo mediado pelos

membros da família CD28/B7.¹⁵ (figura 10) Um homólogo do CD28, o **CTLA-4** (antígeno de linfócito T citotóxico), receptor co-inibidor expresso pelas células T reguladoras CD4 e CD8 e supra-regulado na activação das células T *naive* nos tecidos linfóides, apresenta uma afinidade superior aos ligandos **B7**. Deste modo, ao inibirmos o CTLA-4, promovemos uma resposta anti-tumoral duradoura.¹⁶ Efectivamente, foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration), em 2011, um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (**Ipilimumab**), que demonstrou apresentar benefícios na sobrevivência de doentes com melanoma.¹⁷

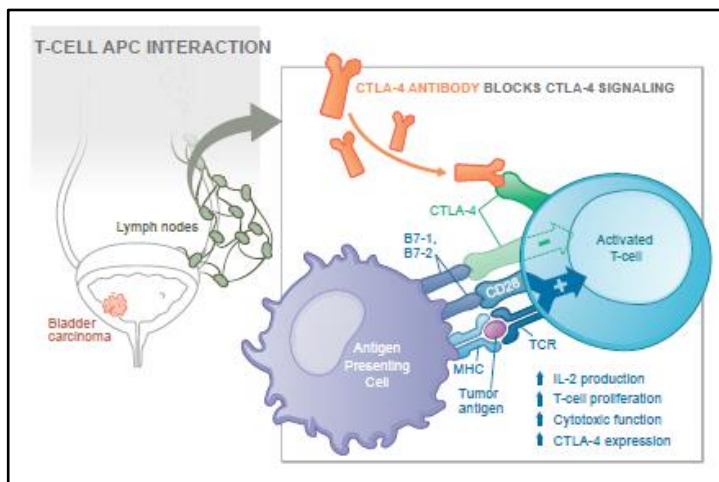


Figura 10. Interação APC - célula T (CTLA-4/B7).⁹

3. Inibidores Anti PD-1/PDL-1

A interação entre **PD-1** (*programmed cell death-1*) e os seus ligandos **PDL-1** (*programmed death ligand-1*) e **PDL-2** (*programmed death ligand-2*) corresponde a um outro *checkpoint* imunitário.

(figura 11) O PD-1, proteína transmembranar do tipo I, é expresso nas células T, células B e células NK, enquanto que PDL-1 e PDL-2, membros da família B7 das moléculas co-estimuladoras e co-inibitórias, são expressos nas APCs e outras células não

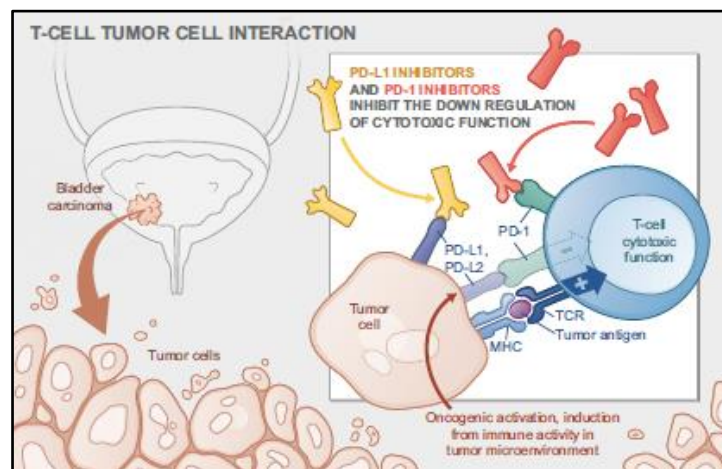


Figura 11. Interação APC - célula T (PD1/PDL1).⁹

hematopoiéticas, como células cancerígenas. A sua ligação conduz a uma atenuação das respostas imunitárias.¹⁸

Deste modo, foram produzidos anticorpos anti PD-1 (**Nivolumab**, **Pembrolizumab**) e anti-PDL-1 (**Atezolizumab**, **Durvalumab**, **Avelumab**), que já demonstraram eficácia clínica em pacientes com melanoma avançado, cancro do pulmão de não-pequenas células, carcinoma urotelial e carcinoma de células renais.¹⁹

Actualmente, existem 5 inibidores de *checkpoint* imunitários aprovados pelo FDA para terapêutica de 2ª linha do cancro urotelial localmente avançado e/ou metastizado (Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab, Pembrolizumab e Nivolumab), sendo que dois deles (Pembrolizumab e Atezolizumab) estão aprovados para primeira linha, no caso destes pacientes não se encontrarem elegíveis à cisplatina. (figura 12) Todos eles são prescritos e têm perfis de eficácia e toxicidade comparáveis.

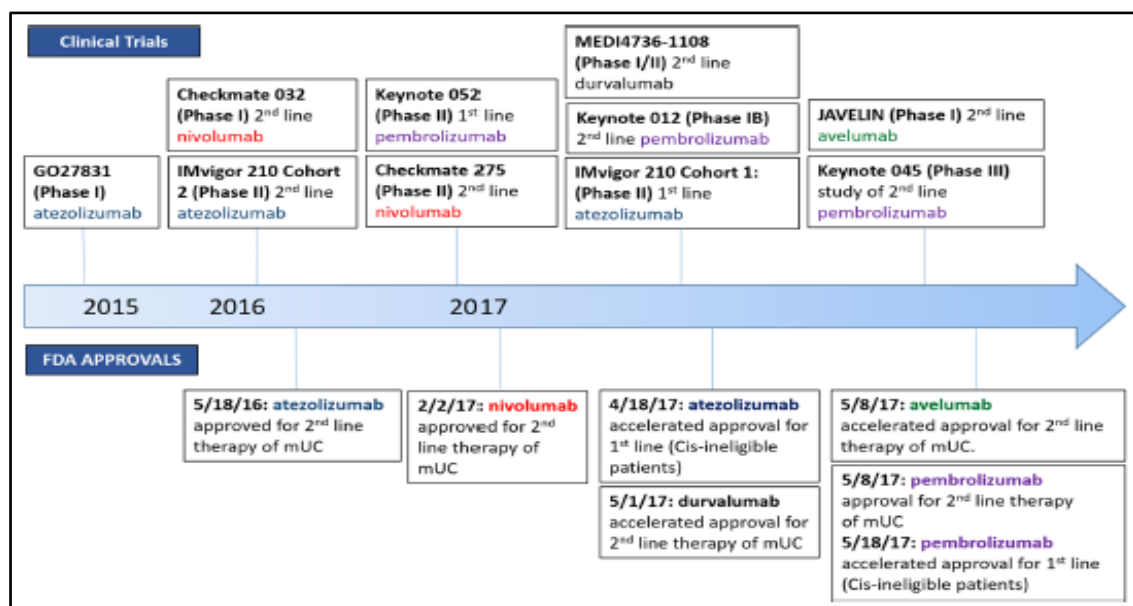


Figura 12. Cronologia da aprovação de inibidores de *checkpoint* imunitários no tratamento do cancro urotelial da bexiga.⁴⁹

3.1. Atezolizumab

O Atezolizumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1, anti-PDL1, inibindo a interação PD1/PDL1.²⁰

Um estudo de fase I (PCD4989g), foi realizado, com a participação de doentes com cancro urotelial metastático, sujeitos previamente a quimioterapia. Foi obtida uma

ORR=39% na *cohort* com expressão de PDL-1 positiva nas células imunitárias infiltrativas, em oposição aos 12% dos PDL-1 negativos. No que diz respeito à toxicidade obtida, deve-se ter em conta o baixo *status performance* destes pacientes, antes da terapêutica, com *clearances* de creatinina <60 ml/min, 75% com metástases viscerais e 42% sujeitos a quimioterapia prolongada. Cerca de 57% teve efeitos adversos de grau 1 a 3, com diminuição do apetite, fadiga, náuseas e calafrios, não havendo complicações de grau 4 ou 5.²¹

Um **estudo de fase II (IMvigor210)**, não aleatorizado, permitiu avaliar a sua eficácia e perfil de segurança, com a administração intravenosa de uma dose de 1200mg, a cada 3 semanas, a 2 *cohorts* de pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado. A *cohort A* incluía pacientes não elegíveis para a cisplatina e a *cohort B* pacientes que progrediram durante ou depois do tratamento com cisplatina. A expressão PDL-1 nas células imunitárias infiltrativas do tumor foi avaliada por IHC, em que os pacientes foram categorizados em 3 subgrupos: IC₀ (<1%), IC₁ (1-5%) e IC_{2/3} (>5%).²² Na *cohort B*, obteve-se uma ORR=16%, sendo que os PDL-1 positivos obtiveram melhores resultados, com uma ORR=28%. A OS (sobrevida total) foi de 7,9 meses, para IC_{1/2/3} foi de 8,8 meses, e para IC_{2/3} foi de 11,4 meses. A PFS (sobrevida livre de progressão) foi de 2,1 meses, independentemente do *status* PDL-1.²³ Após a obtenção destes resultados, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou, em Maio de 2016, o Atezolizumab para o tratamento de pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado, que **progrediram durante ou após quimioterapia contendo cisplatina**.²⁰ Na verdade, mesmo no subgrupo de menor expressão de PDL-1, os resultados obtidos foram melhores do que com a terapêutica *standard* (quimioterapia),

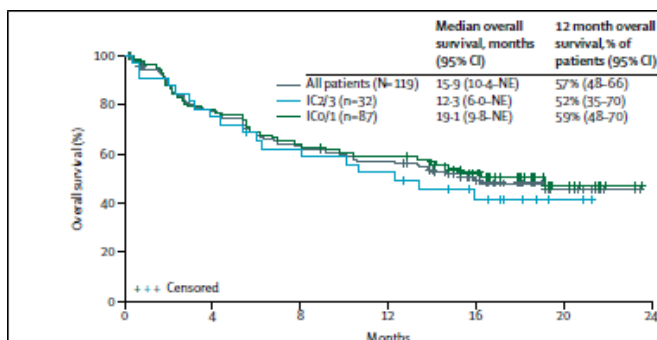


Figura 13. OS (Overall Survival) de pacientes submetidos a Atezolizumab de acordo com a expressão de PDL-1 das células imunitárias infiltrativas.²²

no que diz respeito à tolerância e duração.

No que diz respeito à *cohort A*, obteve-se uma ORR=23%, não existindo uma diferença significativa entre o grupo PDL-1 positivo (ORR=28%) e PDL-1 negativo (21%). A OS obtida foi de 15,9 meses.²³ (figura 13) Pelos

resultados obtidos, o Atezolizumab foi aprovado como terapêutica de 1ª linha para o

tratamento de doentes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado, **não elegíveis para quimioterapia contendo cisplatina.**²¹

O tratamento foi bem tolerado em ambas as *cohorts*, com efeitos adversos de qualquer grau (fadiga, náuseas, anorexia, prurido, febre, diarreia, rash ou artralgia) ocorrendo em cerca de 69% dos pacientes, sendo 15-16% de grau 3 ou 4, e tendo havido uma morte por sépsis relacionada com a terapêutica. Diversas investigações estão a ser realizadas no sentido de avaliar o Atezolizumab em monoterapia e em combinação com a quimioterapia ou outros agentes imunológicos, em diferentes estadios da doença.²²

Um **estudo de fase III (IMVigor 211)** foi realizado no sentido de comparar o Atezolizumab com a quimioterapia de 2ª linha (taxano e vinflunina) em pacientes refractários à cisplatina. (figura 14) Foi obtida uma OS de 11,1 meses para o Atezolizumab, comparativamente com 10,6 meses para a quimioterapia no subgrupo IC_{2/3}. Como o

Clinical Trial	Phase	Study Population	Experimental Group	Comparator	Sample Size (n)	ORR	ORR by PD-L1 Subgroup	OS (median)
PCD4989g	I	Second-line Metastatic UBC	Atezolizumab	Single arm	94	27%	39% (IC 2/3) 12% (IC 0/1)	10.1 months
IMVigor210 Cohort B	II	Second-line, Metastatic UBC	Atezolizumab	Single arm	310	16% ORR	28% (IC 2/3) 10% (IC 0/1)	7.9 months
IMVigor 210 Cohort A	II	First-line, cisplatin ineligible, Metastatic UBC	Atezolizumab	Single arm	119	23% ORR	28% (IC2/3) 21% (IC 0/1)	15.9 months
IMVigor 211	III	Second-line Metastatic UBC	Atezolizumab	Single-agent docetaxel, paclitaxel, or vinflunine	931	13% (atezo) vs 13% (chemo)	IC 2/3: 23% (atezo) vs 22% (chemo) IC 0/1: NR	IC 2/3: 11.1 mos (atezo) vs 10.6 ms (chemo) ITT: 8.6 vs 8.0 ms

Figura 14. Sumário de estudos clínicos usando o Atezolizumab como tratamento do cancro urotelial da bexiga localmente avançado e/ou metastizado.²¹

estudo não conseguiu atingir o seu objectivo primário em melhorar significativamente a OS, não foi possível analisar outros parâmetros. Um estudo adicional de **fase III (IMVigor 130)**, comparando o Atezolizumab com ou sem quimioterapia baseada na cisplatina vs quimioterapia baseada na cisplatina isolada, irá definir o papel do Atezolizumab como terapêutica de 1ª linha.²¹

3.2. Pembrolizumab

O Pembrolizumab é um anticorpo monoclonal humano IgG4, anti-PD1, inibindo a interação PD1/PDL1.²⁴

Um **estudo de fase Ib (Keynote 012)**, não aleatorizado, foi realizado em pacientes com cancro urotelial avançado e/ou metastizado com expressão de PDL-1 nas células tumorais de pelo menos 1%, sendo administrado, intravenosamente, 10mg/kg de Pembrolizumab, a cada 2 semanas. Foi obtida uma ORR=24% e, no geral, a terapia foi bem tolerada, apesar de 61% dos pacientes ter apresentado efeitos adversos, tais como fadiga, edema periférico e náuseas. Eventos adversos de grau 3 e 4 ocorreram em 4 dos 33 pacientes em estudo.²⁴

Um **estudo de fase II (Keynote 052)** foi apresentado no *Simpósio de Cancros Génito-Urinários*, consistindo na avaliação da actividade e segurança do Pembrolizumab em pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado, não elegíveis para o tratamento de quimioterapia contendo cisplatina, através da administração de uma dose de 200mg, a cada 3 semanas. Para uma melhor caracterização dos responsivos e não responsivos, foi determinada a expressão de PDL-1 nas células tumorais e nas células imunitárias. Foi obtida uma ORR=27%, ainda não tendo sido reportados os resultados de acordo com a expressão PDL-1.²⁵

Um **estudo de fase III (Keynote 045)**, foi realizado no sentido de comparar o Pembrolizumab com a Quimioterapia (paclitaxel, docetaxel ou vinflunina) em pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado, recorrendo ou progredindo após quimioterapia baseada na cisplatina. (*figura 15*) Os resultados obtidos demonstram um benefício de sobrevivência por parte do grupo de Pembrolizumab, com uma OS de 10,3 meses (versus 7,4) e uma *ratio* para morte de 0,73 (versus 9,1). A ORR foi também significativamente melhor no grupo de Pembrolizumab (21,1% versus 11,4%), tal como os efeitos adversos foram em menor número, com excepção do prurido, anormalidades tiroideias, colite e pneumonite.²⁶ Estes benefícios foram idênticos em praticamente todos os subgrupos examinados, independentemente da expressão de PDL-1, do tipo de quimioterapia, ou da presença de factores de mau prognóstico, como a presença de metástases hepáticas.²⁷ Assim, o Pembrolizumab torna-se a primeira evidência de nível 1 para o uso de inibidores de *checkpoint* imunitários no **cancro urotelial localmente avançado e/ou metastizado, como 1ª linha de tratamento.**²⁶

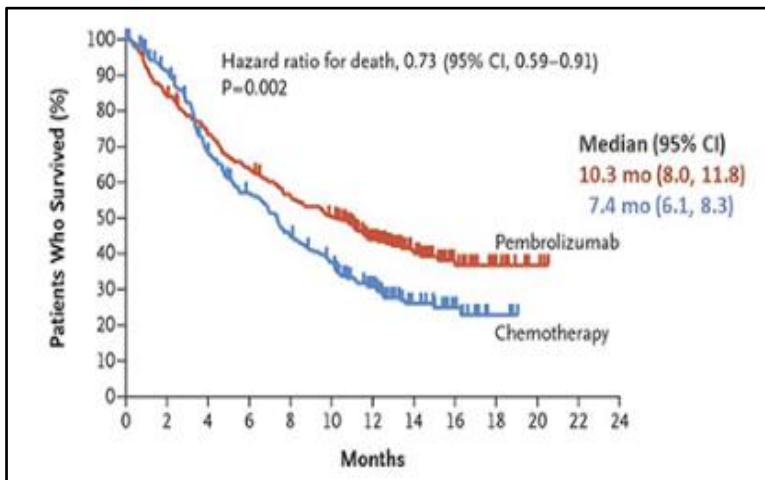


Figura 15. OS (Overall survive) de pacientes submetidos a Pembrolizumab vs Quimioterapia.²⁵

O tratamento foi bem tolerado e apenas 9% dos pacientes apresentaram efeitos adversos. Vários estudos estão a ser realizados no sentido de avaliar a actividade do Pembrolizumab em combinação com outras terapias sistémicas e radioterapia.²⁴

3.3. Durvalumab

O Durvalumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1, anti-PDL1, inibindo selectivamente a interação PD1/PDL1.¹⁶

Um **estudo de fase I/II**, de forma a avaliar a segurança, tolerância e actividade anti-tumoral em pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado que progrediram durante ou após quimioterapia contendo cisplatina, este foi administrado, intravenosamente, com uma dose de 10mg/kg, em cada 2 semanas. Os pacientes foram categorizados com base na expressão de PDL-1 das células tumorais ou das células imunes infiltrativas (*cut-off* de 25%). Foi obtida uma ORR=31%, com melhores resultados no subgrupo de PDL-1 positivo (ORR=46%) comparativamente com os PDL-1 negativos (ORR=0%).²⁸ Um *update* deste estudo foi apresentado no *Simpósio de*

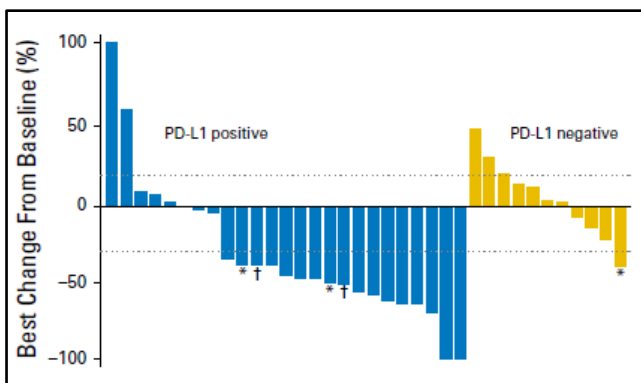


Figura 16. Mudanças do tamanho do tumor, de acordo com o status PDL-1, após terapêutica com Durvalumab.²⁸

Cancro Génito-urinário ASCO, em 2017, apresentando uma ORR total de 20,4%, sendo 29,5% nos PDL-1 positivos e 7,7% nos PDL-1 negativos. (figura 16) Em Fevereiro de 2016, a FDA aprovou o Durvalumab como tratamento para carcinomas uroteliais inoperáveis PDL-1 positivos e **carcinomas**

uroteliais metastizados, que progrediram durante ou após quimioterapia contendo cisplatina.¹⁶

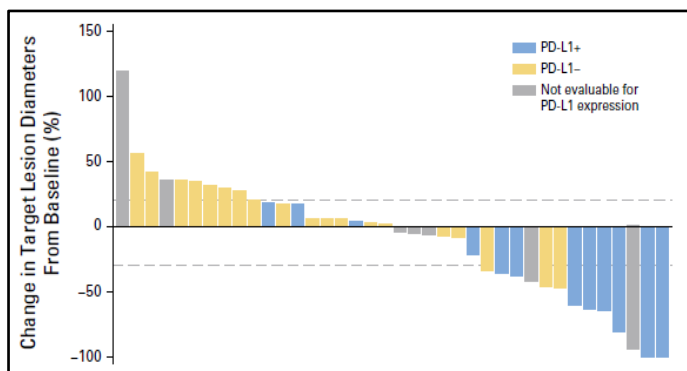
A tolerância ao tratamento foi ótima, com efeitos adversos ocorrendo em apenas 4,9% dos pacientes (fadiga, diarreia e diminuição do apetite), sem eventos de grau 4 e 5, e sem mortes relacionadas com o tratamento. Diversas investigações estão a ser realizadas no sentido de avaliar a actividade do Durvalumab em monoterapia ou em combinação com o anti-CTLA-4, Tremelimumab.¹⁶

3.4. Avelumab

O Avelumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1, anti-PDL1, inibindo a interação PD1/PDL1.

Um **estudo de fase Ib** foi realizado no sentido de investigar a segurança, tolerância e actividade clínica em pacientes com tumores localmente avançados e/ou metastizados, incluindo os não elegíveis a quimioterapia contendo cisplatina e os que progrediram após esta. Ao receberem uma dose de 10mg/kg em cada 2 semanas, foi obtido uma ORR=16,5% e uma PFS de 6,1 semanas, tendo sido apresentado no *Congresso ESMO* em 2016.²⁹

Um *update* deste estudo foi apresentado no *Simpósio de Cancro Génito-Urinário ASCO* em 2017, obtendo-se uma ORR=17,6% e uma OS de 7 meses. Determinando a expressão de PDL-1 nas células tumorais ou nas células imunes infiltrativas, com um *cut-off* de 5%, obteve-se uma ORR=25%



para o subgrupo PDL-1 positivo, **Figura 17.** Mudanças do tamanho do tumor, de acordo com o *status* PDL-1, após terapêutica com Avelumab.³⁰

para o subgrupo PDL-1 negativo, com ORR=14,7%. (*figura 17*). O Avelumab foi aprovado, então, pela FDA como tratamento para **carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado que progrediu durante ou após quimioterapia contendo cisplatina.**³⁰

O tratamento foi bem tolerado, com efeitos adversos de grau ≥ 3 a ocorrer em cerca de 7,5% dos pacientes, conduzindo a uma morte por pneumonite relacionada com a terapêutica. Um **estudo de fase III**, aleatorizado, está a ser realizado no sentido de

comparar a actividade do Avelumab juntamente com o melhor cuidado de suporte vs melhor cuidado de suporte, como terapêutica de manutenção após quimioterapia contendo cisplatina.²⁹

3.5. Nivolumab

O Nivolumab é um anticorpo monoclonal humano IgG4, anti-PD1, inibindo a interação PD1/PDL1.

Um **estudo de fase I/II (Checkmate 032)**, não aleatorizado, permitiu avaliar a segurança e actividade do Nivolumab como monoterapia e em combinação com o Ipilimumab (anti-CTLA-4), em pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado e/ou metastizado que progrediram durante ou depois da quimioterapia contendo cisplatina. Foi administrado 3mg/kg, intravenosamente, a cada 2 semanas, de Nivolumab, obtendo-se uma ORR=24,4%, não havendo uma diferença significativa entre os PDL-1 positivos (ORR=26,2%) e os PDL-1 negativos (ORR=24%), utilizando como *cut-off* a expressão PDL-1 \geq 1. Em termos de tolerância, cerca de 21,8% dos pacientes apresentaram efeitos adversos de grau 3 ou 4, com aumento das enzimas lípase e amílase, dispneia e fadiga. Pneumonite e trombocitopenia, efeitos adversos de grau 5, foram obtidos em 1 dos 78 pacientes avaliados.³¹

Um **estudo de fase II (Checkmate 275)** confirmou os resultados positivos obtidos no estudo anterior, com uma ORR=19,6%. Obteve-se uma ORR=28,4% nos PDL-1 \geq 5%, 23,8% nos PDL-1 \geq 1%, e 16,1% nos PDL-1<1%. Obteve-se uma PFS de 2 meses e uma OS de 8,74 meses em toda a população estudada, 11,3 meses nos PDL-1 \geq 1%, e 5,95 meses nos PDL-1 negativos. (figura 18) Cerca de 18% dos pacientes apresentou efeitos adversos de grau 3 e 4, com fadiga e diarreia, sendo que apenas 1% apresentou efeitos de

grau 5.³²

Vários estudos estão a ser realizados no sentido de estudar a combinação de Nivolumab com o Ipilimumab. Um deles corresponde ao **Checkmate 032**, apresentado no *Simpósio de Cancro Génito-Urinário ASCO* em 2017, onde se compararam diferentes doses e

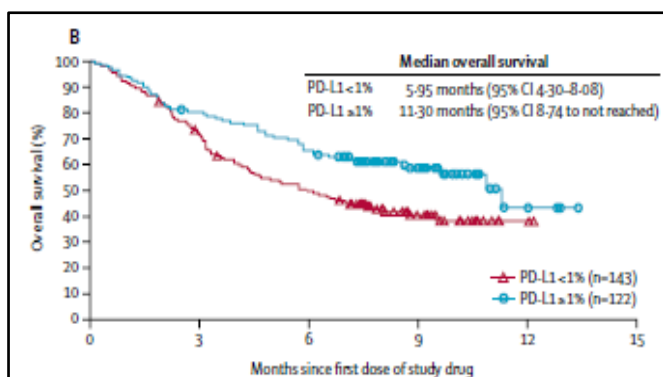


Figura 18. OS (Overall survive) em pacientes submetidos a Nivolumab, de acordo com a expressão PDL-1.³²

combinações em pacientes com carcinoma urotelial avançado. A *cohort A*, tendo sido administrado 1mg/kg Nivolumab + 3mg/kg Ipilimumab, apresentou uma ORR=38,5%, com 30,8% de efeitos adversos de grau 3 e 4. A *cohort B*, tendo sido administrado 3mg/kg Nivolumab + 1mg/kg Ipilimumab, apresentou uma ORR=26,0%, com 31,7% de efeitos adversos de grau 3 e 4. Por fim, a *cohort C*, tendo sido administrado 3mg/kg Nivolumab, apresentou uma ORR=25,6%, com 23,1% de efeitos adversos de grau 3 e 4. De facto, obteve-se uma melhoria de resposta, tendo sido acompanhada por aumento de risco de toxicidade relacionada com o tratamento. Dois estudos de fase III estão a avaliar esta combinação terapêutica como terapia de 1ª linha para doença avançada.³¹

4. Imunoterapia e Químio-Radioterapia

De forma a comparar a eficácia da **imunoterapia** com a **quimioterapia de um e dois agentes**, foi realizada uma análise e sumarização da informação dos ensaios dos diferentes grupos de tratamento, com **ORR**, **PFS** e **OS** como *endpoints* primários.

Os estudos de imunoterapia revelam uma estimativa de ORR=21,1%, PFS=1,9 meses e OS=9,1 meses. Em pacientes PDL-1 positivos, a estimativa correspondente é ORR=29,3%, PFS=2,1 meses e OS=10,9 meses. Comparando com a quimioterapia de um agente, obteve-se uma diferença significativa da ORR, mas não da OS, tendo sido este último obtido apenas no subgrupo de doentes PDL1 positivos. Notavelmente, não foram encontradas diferenças significativas entre a imunoterapia e quimioterapia de um agente com a quimioterapia de dois agentes.³³ (figura 19)

Variable	ORR			PFS			OS		
	Evaluable Arms	Probability (95% CI)	Notes	Evaluable Arms	Median (95% CI)	Notes	Evaluable Arms	Median (95% CI)	Notes
IT (all comets)	8	21.1 (15.7-27.8)	P^2 : 82.8%; TH: $P < .001$; ET: $P = .432$; no IS	6	1.9 (1.7-2.2)	P^2 : 74.3%; TH: $P = .008$; ET: $P = .601$; 1 IS	5	9.1 (7.7-10.5)	P^2 : 35.1%; TH: $P = .247$; ET: $P = .282$; 2 IS
IT, PDL1+ patients	8	29.3 (22.7-36.9)	P^2 : 63.3%; TH: $P = .011$; ET: $P = .455$; 1 IS	6	2.1 (2.0-2.2)	P^2 : 0.00%; TH: $P = .120$; ET: $P = .299$; 1 IS	5	10.9 (9.4-12.5)	P^2 : 0.00%; TH: $P = .348$; ET: $P = .595$; 1 IS
Single-agent CT	23	13.9 (11.1-17.4)	P^2 : 52.9%; TH: $P = .002$; ET: $P = .407$; 1 IS	19	2.7 (2.3-3.1)	P^2 : 82.8%; TH: $P < .001$; ET: $P = .018$; no IS	21	6.9 (6.2-7.7)	P^2 : 67.8%; TH: $P < .001$; ET: $P = .015$; 1 IS
Doublet CT	24	31.8 (27.3-36.9)	P^2 : 38.2%; TH: $P = .030$; ET: $P = .008$; no IS	15	3.8 (3.4-4.2)	P^2 : 0.03%; TH: $P = .136$; ET: $P = .001$; 1 IS	23	8.3 (7.2-9.5)	P^2 : 67.2%; TH: $P < .001$; ET: $P < .001$; no IS

Abbreviations: CI = confidence interval; CT = chemotherapy; ET = Egger's test for funnel plot asymmetry; IS = influential study; IT = immunotherapy; ORR = objective response rate; OS = overall survival; PDL1 = programmed cell-death ligand 1; PFS = progression-free survival; TH = test for heterogeneity.

Figura 19. Sumário e comparação dos resultados obtidos após Imunoterapia, Quimioterapia de um agente e Quimioterapia de 2 agentes.³³

Na verdade, removendo o contributo do estudo Keynote-045, verifica-se uma **perda da tendência de favorecer a imunoterapia sobre a quimioterapia**. Estes resultados não são uma surpresa, devido à influência por parte dos estudos de fase II do Atezolizumab e do Nivolumab, onde se obteve resultados de OS medianas inferiores, independentemente da expressão de PDL-1. Contudo, no geral, a diferença da OS entre os estudos de imunoterapia e os de quimioterapia de um agente foi de, aproximadamente, 2,02 meses.³³ Existe um esforço acrescido no que diz respeito à procura de estratégias de tratamento de primeira linha para tumores uroteliais metastizados, com a procura de **combinar a imunoterapia com a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante**. Estudos revelam que a expressão de PDL-1 aumenta após a quimioterapia neoadjuvante, pelo que poderá ser um momento importante para o uso dos bloqueadores anti-PD1/PDL-1.³⁴ Inibidores da tirosina-cinase, anti-angiogénicos e outros agentes imunomoduladores estão também a ser estudados, devido ao seu potencial de aumentar a actividade dos inibidores de *checkpoint* imunitários.³³

4.1. Quimioterapia e Radioterapia

O benefício clínico da **Quimioterapia** baseada na cisplatina é suportado pela evidência obtida de múltiplos ensaios controlados e aleatorizados, apesar do seu conhecido potencial para nefrotoxicidade, ototoxicidade e emese.²⁹ Na verdade, a quimioterapia neoadjuvante na doença músculo-invasiva, antes da cistectomia, faz aumentar a sobrevivência destes pacientes.³⁴ No que diz respeito à adjuvância, nunca foi provado definitivamente que melhorava os valores de sobrevida, apesar de ser frequentemente utilizada. Contudo, mais de dois terços dos pacientes não se encontram elegíveis para receber quimioterapia, devido a disfunção renal, baixo *status performance*, perda auditiva, neuropatia periférica e/ou insuficiência cardíaca. Apesar dos benefícios, os seus resultados positivos mantêm-se baixos, pelo que existe a necessidade de novas terapêuticas.³⁵

No que diz respeito à **Radioterapia**, esta tem demonstrado uma actividade sinérgica com os inibidores *checkpoint* inibitórios. Na verdade, a radioterapia fraccionada promove o aumento da produção de IFN- γ e uma sobrerregulação das moléculas MHC, conduzindo, assim, a um aumento da resposta à imunoterapia.¹⁵ Ao serem analisadas biópsias de pacientes tratados com **Quimio-Radioterapia**, notou-se que a expressão elevada de

PDL1 estava associada a um baixo número de respostas completas e a uma taxa de sobrevida menor, sugerindo um importante potencial de tratamento a combinação dos inibidores anti-PD1/PDL1 com a Quimio e a Radioterapia.³⁵

5. Efeitos adversos

Os inibidores de *checkpoint* imunitários têm conduzido uma taxa de sobrevivência aos 12 meses de 36%, sendo que nos PDL-1 positivos, a taxa é particularmente grande, acima dos 48%. Mas, como todos os outros tratamentos, apresentam efeitos adversos, similares entre os diferentes agentes.¹² Em termos fisiológicos, nos tecidos periféricos, para além de minimizar a lesão tecidual na inflamação, a ligação PD-1/PDL-1 permite que não haja células T a reagirem contra autoantígenos. Assim, o seu bloqueio pode conduzir a efeitos adversos, como a autoimunidade. É de realçar que a prevenção da autoimunidade é conseguida através da interação entre PD-1/PDL-2. Deste modo, o bloqueio do PD-1 impede esta interação, conduzindo a efeitos adversos autoimunes, ao contrário dos bloqueadores anti-PDL1 que não interferem nesta ligação, prevenindo a autoimunidade provocada pelo bloqueio do PDL-2.³⁶

A inibição de PD-1/PDL-1 está, também, associada a dermatite, diarreia e fadiga em 20-30% dos pacientes. A colite severa é rara, e a pneumonite foi reportada em mais de 3% dos pacientes.¹⁵ Hepatites, nefrites, endocrinopatias e encefalites já foram, também, associadas a estas terapias.¹⁹ Globalmente, estes efeitos adversos são melhor tolerados, com toxicidades de grau 3-4 em cerca de 10% dos pacientes, em oposição aos 20-50% dos pacientes sujeitos aos anti-CTLA-4 e aos 30% dos sujeitos a quimioterapia. Na terapia combinada, anti-PD1/PDL1 e anti-CTLA-4, a toxicidade também aumenta em número e em grau.³⁷ (figura 20)

ICI target	Arms analyzed that reported grade 3+ irAE	Reported number of patients with grade 3+ irAE	Number of patients evaluated for irAE	% patients with grade 3+ irAE ^b	Evaluable patients for response	Complete response rate in these arms ^b	Overall response rate in these arms ^b
CTLA-4	25	487	1862	21.5%	1670	2.6%	11.3%
PD-1	20	119	1530	7.1% ^a	1259	5.6%	26.4%
PD-L1	6	49	790	6.3% ^a	790	6.8%	22.2%
PD-1 + CTLA-4	1	172	314	54.8%	314	11.5%	57.6%
PD-L1 + CTLA-4	1	3	18	16.7%	18	NR ^c	NR
Total/P	53	830	4514	$P < 0.001$	4051	$P < 0.001$	$P < 0.001$

^a $P = 0.676$
^b % Calculated based on meta-analysis with weighted by inverse variance.
^c Not Reported.

Figura 20. Perfil de toxicidade de cada inibidor de *checkpoint* imunitário, através da percentagem de doentes que apresentaram efeitos adversos de grau 3 ou mais.³⁷

6. Resistência aos inibidores de *checkpoint* imunitários

Com a utilização dos inibidores *checkpoint* imunitários, cerca de 20% dos doentes apresentam respostas duradouras. Contudo, na maioria dos casos, a imunoterapia é insuficiente.¹⁵ A sua eficácia raramente excede os 40% e, havendo um grande número de respostas parciais, a recorrência e a progressão ainda são uma realidade.³⁸ Este fenómeno ocorre devido a mecanismos de resistência primária e adquirida, associados a factores intrínsecos e extrínsecos das células tumorais. (figura 21)

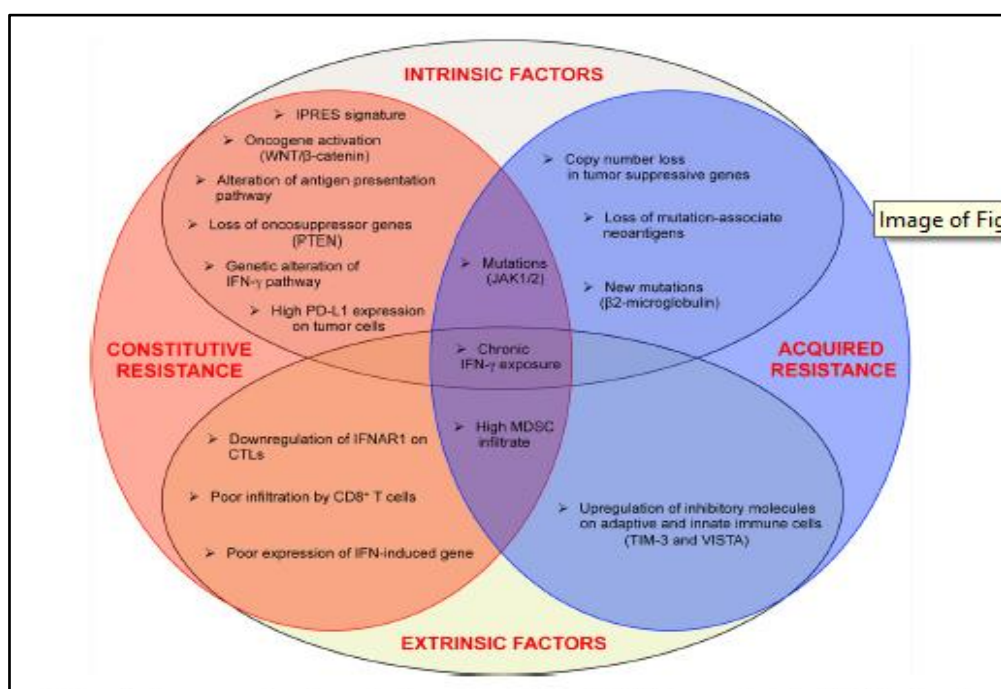


Figura 21. Mecanismos de resistência aos inibidores *checkpoint* imunitários.⁴²

6.1. Resistência primária

No que diz respeito à resistência primária, esta está associada à falta de resposta aos inibidores de *checkpoint* imunitários, numa fase inicial. Engloba a resistência por parte do **microambiente imunitário tumoral (TIME)**, **assinaturas de resistência inapta anti-PD1 (IPRES)** e **factores intrínsecos tumorais**.³⁹

6.1.1. TIME

É conhecido que o TIME é dinâmico e regulado por complexas interações entre os tecidos tumorais e as células imunitárias, promovendo uma inflamação crónica e um ambiente imunossupressor, ideal para o desenvolvimento e progressão tumoral. Neste enquadramento, em primeiro lugar, existe uma supraregulação do PD-1, através da

sinalização oncogénica constitutiva da sua expressão. Esta constitui a premissa da terapia de bloqueio PD-1/PDL-1 e, apesar da resposta à terapia anti-PD1/PDL-1 ser, de facto, maior em grupos de populações PDL1 positivos, esta positividade, por si só, não pode ser considerada como um factor preditivo de resposta a esta terapêutica, uma vez que esta depende também do **número de TILs (tumor infiltrating lymphocytes) presentes**.³⁹

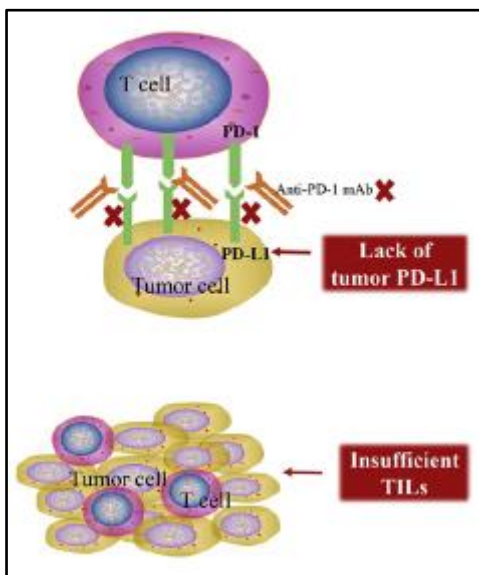


Figura 22. Perda da expressão tumoral de PDL-1 e presença de um número insuficiente de TILs.³⁹

(figura 22) Estes dados são tão relevantes que, com base na expressão de PDL-1 e na presença/ausência de TILs, *Teng et al* fizeram uma divisão destes tumores em 4 grupos: **tipo I** (PDL-1 positivo, com TILs), **tipo II** (PDL-1 negativo, sem TILs), **tipo III** (PDL-1 positivo, sem TILs), **tipo IV** (PDL-1 negativo, com TILs). Entre estes, os tipo I são os mais fortes candidatos a responder ao bloqueio PD-1/PDL-1.⁴⁰

Em segundo lugar, a **“exaustão” de células T CD8** define a sua disfunção em muitas infecções crónicas e cancros. (figura 23) Corresponde a uma fraca função efectora, devido a uma expressão permanente de receptores inibitórios e a um estado transcripcional diferente das células T efectoras funcionais.⁴¹ Este fenótipo de exaustão compreende uma perda da actividade proliferativa e citolítica, conduzindo a defeitos na produção de citocinas, uma sobre-expressão de receptores inibitórios como TIM3, VISTA, CTLA-4, LAG3 e BTLA, e, eventualmente, deleções.¹⁵ O seu potencial de reversão depende da expressão de PD-1 por parte destas células. No caso dessa expressão

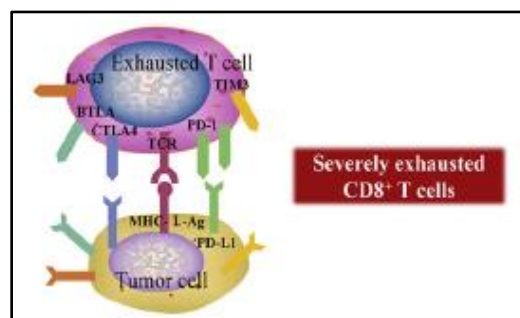


Figura 23. Exaustão de células T CD8 com fenótipo PD1 positivo.³⁹

ser baixa, a reversão é mais facilmente conseguida, em oposição a uma expressão aumentada. Assim, a combinação de inibidores *checkpoint* PD-1/PDL-1 com anticorpos que bloqueiem os receptores inibitórios co-expressos pode melhorar a resposta anti-tumoral por parte de pacientes com este fenótipo.³⁹ Outro processo encontrado na resistência tumoral é o **silenciamento epigenético do CXCL9 e CXCL10**, quimiocinas

essenciais na migração das células T do sistema circulatório para o tecido tumoral. (figura 24) A sua baixa expressão, juntamente com a diminuição da produção de IFN- γ , conduz a uma diminuição da migração celular imunitária, podendo interferir no efeito da imunoterapia. É de realçar que

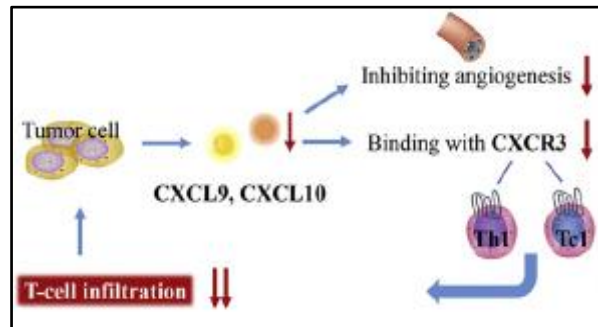


Figura 24. Silenciamento epigenético do tipo Th1 das quimiocinas CXCL9 e CXCL10.³⁹

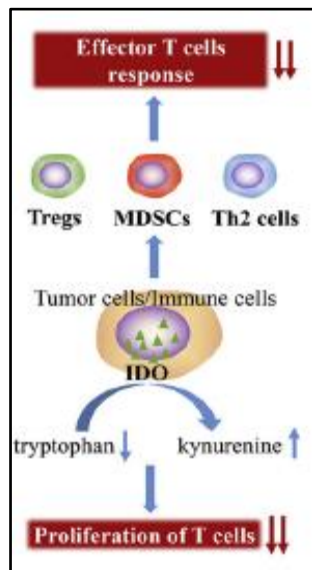


Figura 25. Presença de IDO e aumento da actividade das células T reguladoras e MDSCs.³⁹

do TIME, diminuindo, posteriormente, a eficácia dos anti-PD1/PDL1.³⁹

imunoterapêutica. O tratamento com moduladores epigenéticos tem demonstrado um aumento da presença de TILs no tecido tumoral, resultando num aumento da eficácia dos inibidores PD-1/PDL-1.⁴² **Células imunitárias presentes no TIME** também constituem uma fonte significativa de imunossupressão. (figura 25) Células T reguladoras, células Th2 e células supressoras (MDSCs), cuja actividade é promovida pela produção de IDO (índole 2,3-dioxigenase), suprimem as respostas imunitárias via Th1, dificultando a acção dos inibidores de *checkpoint*. Deste modo, a sua combinação com a inibição sistémica da IDO é uma opção bastante válida. Outra situação que se deve ter em conta é a resistência adquirida **após terapia de inibição da MAPK**, que conduz a uma modulação

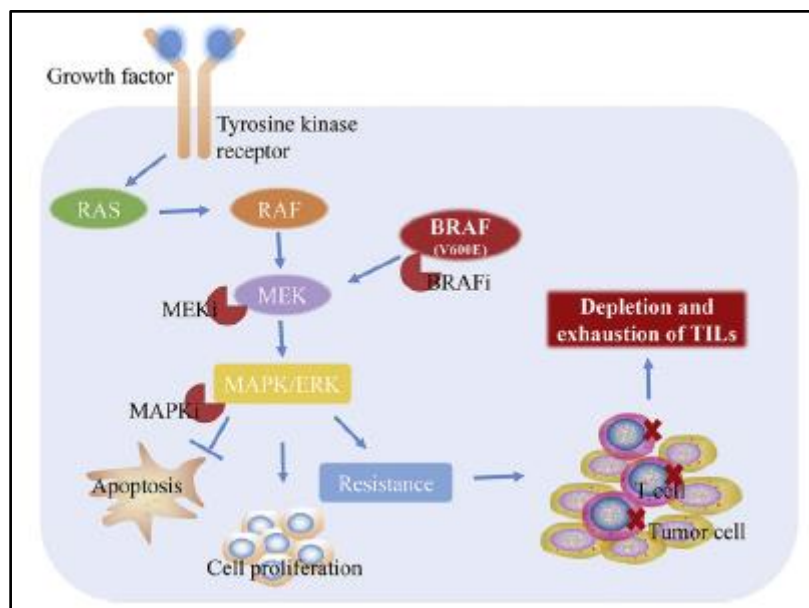


Figura 26. Resistência adquirida após terapia de inibição da MAPK.³⁹

6.1.2. Assinaturas de Resistência Inapta anti-PD1 (IPRES)

Adicionalmente às alterações ocorridas no TIME, foi também relacionado com a resistência primária ao bloqueio dos inibidores PD-1/PDL-1 um co-enriquecimento de um grupo de vinte e seis assinaturas de transcrição, denominadas **assinaturas IPRES** (figura 27), associado a um aumento da expressão de genes imunossupressores, da transição mesenquimal, de quimiotáticos de leucócitos e outros relacionados com a angiogénese.⁴² Um exemplo corresponde ao aumento da expressão de VEGF, conduzindo a uma redução da função das células T efectoras e correlacionando-se com uma expressão elevada de PD-1 nas células CD8. Assim, é razoável especular que a terapêutica de combinação do bevacizumab (anti-VEGF) com o anti-PD1 pode ter um efeito sinérgico.³⁹

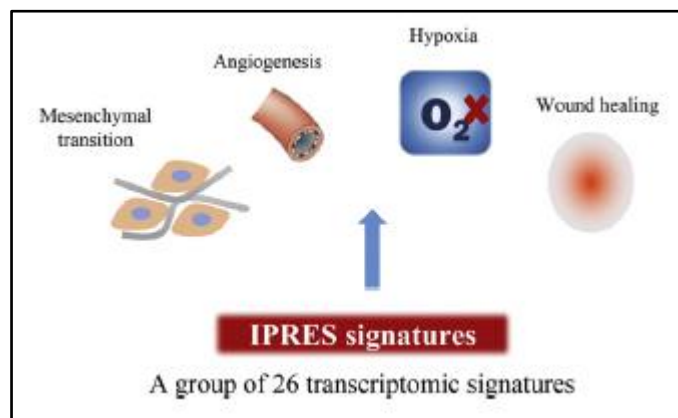


Figura 27. Assinaturas IPRES.³⁹

6.1.3. Factores intrínsecos tumorais

Os tumores têm a capacidade de expressar antígenos não pertencentes ao genoma humano, sendo denominados **neoantígenos**. Quanto maior a sua presença, maior a taxa mutacional do tumor, e maior o número de TILs. Assim, tornam-se mais sensíveis à terapia anti-PD1. A baixa imunogenicidade de certos tumores pode ser uma das razões pelas quais o desenvolvimento de células T seja limitado, condicionando, assim, a terapêutica.⁴³ Outro mecanismo associado a este tipo de resistência tumoral é a **perda de expressão do gene supressor de tumor, o PTEN**. Deste modo, ocorre uma activação da sinalização PI3K-AKT, aumentando a expressão de citocinas imunossupressoras e reduzindo o número de TILs. Assim, a utilização de um inibidor PI3K faz aumentar a eficácia da terapêutica anti-PD1/PDL1.¹⁹ Assim como a perda de expressão do PTEN, outros tipos de sinalização são também alterados, nomeadamente a **activação do**

WNT/catenina, também correlacionada com um baixo número de TILs. Estes sinais oncogénicos, em particular, escondem novos candidatos terapêuticos para potenciação imunitária.⁴²

6.2. Resistência adquirida

Relativamente à resistência adquirida, esta é caracterizada pela evolução dos **neoantígenos tumorais**, **mutações do JAK1/JAK2**, **mutações da $\beta 2$ -microglobulina** e pela **estabilidade epigenética de células T “exaustas”**.

6.2.1. Evolução dos neo-antígenos tumorais

Como referido anteriormente, a presença de neoantígenos conduz à activação de resposta imunitária. (figura 28) Deste modo, a pressão selectiva do bloqueio PD-1/PDL-1 conduz a uma **perda desses mesmos neoantígenos**, essenciais para o seu reconhecimento, tais como os que influenciam a ligação TCR e a afinidade ao MHC.³⁹ A transferência de células T específicas e a utilização de vacinas tem sido uma das apostas por parte da imunoterapia, com a utilização de neoantígenos identificados no momento da progressão tumoral.¹⁵

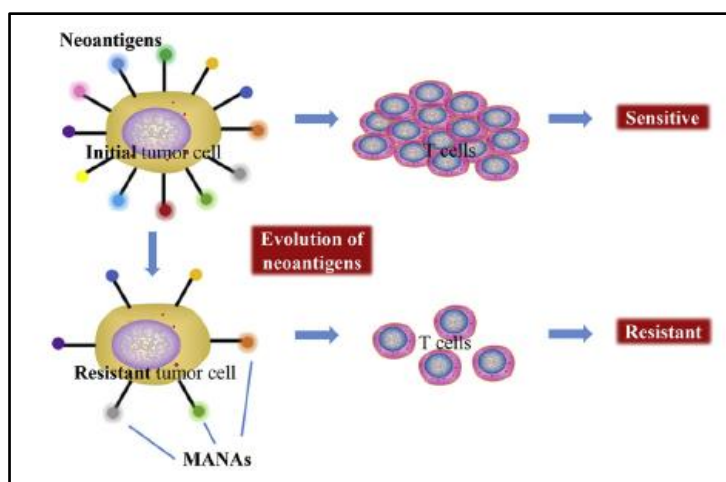


Figura 28. Perda da expressão de neoantígenos.³⁹

6.2.2. Mutações do JAK1/JAK2

As mutações JAK, apesar de não serem detectadas inicialmente, estão associadas à recorrência tumoral. (figura 29) JAK1 e JAK2 são essenciais na sinalização do IFN- γ .

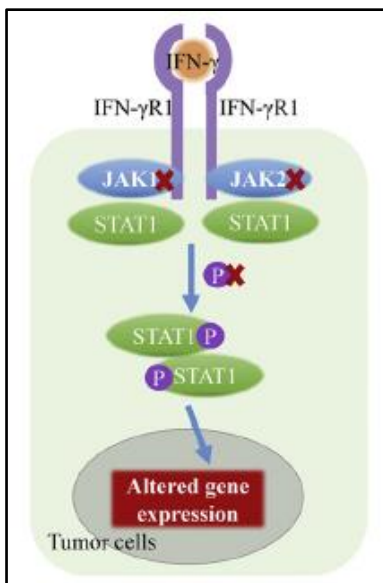


Figura 29. Mutações JAK1/JAK2.³⁹

Assim, apesar das células tumorais poderem continuar a ser reconhecidas pelas células T CD8, estas tornar-se-ão cada vez mais insensíveis à sua inibição.¹⁸ A prolongada sinalização de IFN-γ pode também gerar uma resistência aos inibidores de *checkpoint* inibitórios.³⁹

6.2.3. Mutações da β_2 -microglobulina

A β_2 -microglobulina tem um papel fundamental no suporte de moléculas de MHC

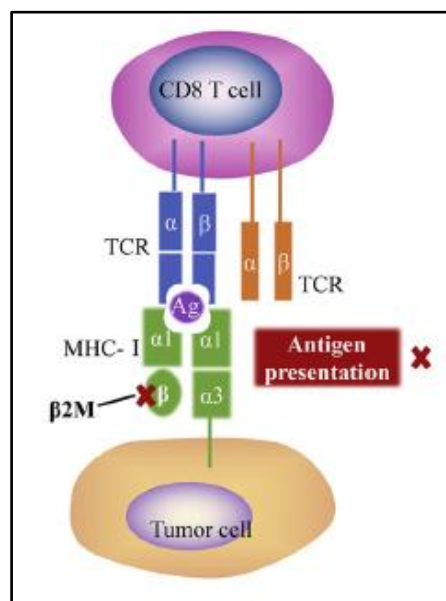


Figura 30. Mutações da β_2 -microglobulina.³⁹

classe I, permitindo a apresentação de péptidos específicos às células T. As mutações nesta molécula são um escape de grande relevância por parte das células tumorais contra ao seu reconhecimento por parte das células T.³⁹ (figura 30)

6.2.4. Estabilidade epigenética

A estimulação persistente durante infecções crónicas e cancro pode resultar na “exaustão” das células T. (figura 31) Assim, a combinação dos inibidores anti-PD1/PDL1 com células T manipuladas ou modificações epigenéticas pode ser a chave para uma melhoria da durabilidade da imunoterapia, no futuro.³⁹

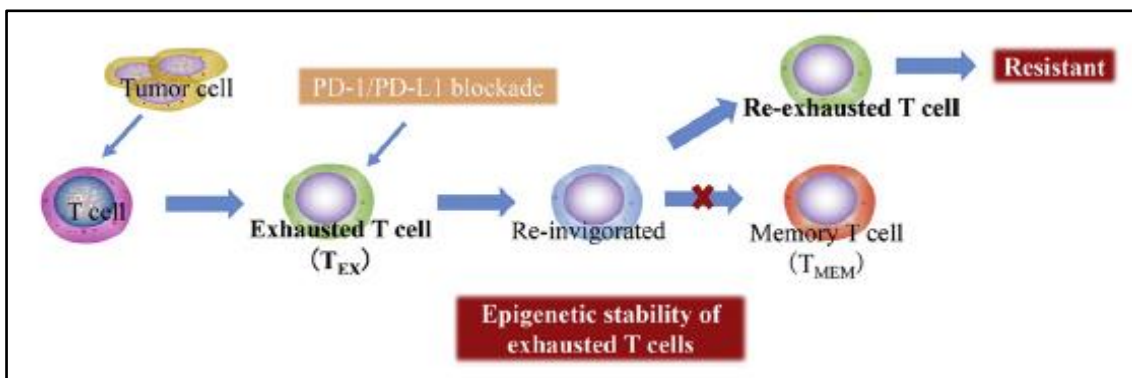


Figura 31. Estabilidade epigenética de células T “exaustas”.³⁹

Concluindo, no que diz respeito à selecção da terapêutica imunológica, é necessária a caracterização do microambiente tumoral e o conhecimento das resistências primárias e adquiridas, para que se consiga tratar cada paciente com o máximo de eficácia e o mínimo de toxicidade.

7. Biomarcadores

A resposta aos inibidores *checkpoint* imunitários é um processo complexo envolvendo o PDL-1, PD-1, CTLA-4, neoantigénios, epigenética, células T e microbioma, em constante interligação. A taxa de resposta aos inibidores *checkpoint* imunitários é similar em todos os estudos realizados, ocorrendo em menos de um terço dos pacientes.⁴⁴ Devido aos custos e toxicidades associadas a esta terapêutica, é imperativo a **determinação de biomarcadores** que permitam uma selecção de pacientes, para um tratamento cada vez mais eficiente, personalizado e individualizado.

7.1. PDL-1

Deste modo, o primeiro marcador a ser estudado foi o **PDL-1**, expresso na membrana celular e detectado através da imunohistoquímica, correlacionando-se com a resposta aos anticorpos anti-PD1/PDL-1 nos casos de melanoma e cancro do pulmão. Inicialmente, nos tumores da bexiga, o PDL-1 expresso nas células tumorais não era requerido para o tratamento do cancro localmente avançado e/ou metastizado, dada a percentagem de respostas positivas de pacientes PDL-1 negativos (10-20%), em muitos estudos.¹⁵ Na verdade, existe uma grande heterogeneidade intra-tumoral, inter-tumoral e inter-individual na expressão de PDL-1. Adicionalmente, a sua expressão pode variar após exposição a quimioterapia e radioterapia, que são duas armas terapêuticas do MIBC, fazendo com que a determinação do PDL-1 nos tecidos das biópsias antes do início da utilização dos inibidores de *checkpoint* possa não ser representativo.⁴⁵ No geral, a expressão de PDL-1 encontra-se presente em 20-30% dos cancros uroteliais.⁴⁶ Estudos revelam que a presença da expressão de PDL-1 está correlacionada com estadios avançados tumorais e elevadas taxas de recorrência pós-operatória (7% nos T_a, 16% nos T₁, 23% nos T₂ e 30% nos T_{3/4}). (figura 32)

Authors	n	Tissue source	Tissue preservation	PD-L1 antibody	PD-L1 positivity threshold (%)	Expression of PD-L1 by tumor cells (%)	Association between PD-L1 status* and pathologic findings/ outcomes?
Bellmunt et al.	160	Bladder	FFPE	405.9a11	> 5	20	PD-L1 expression by tumor cells not associated with stage or OS. Longer median OS associated with PD-L1 expression by tumor-infiltrating mononuclear cells in patients with metastatic disease
Boorjian et al.	318	Bladder	FFPE	5H1	> 5	12	PD-L1 expression by tumor cells and PD-1 by TIMCs significantly associated with higher stage. PD-L1 expression associated with all-cause mortality in organ-confined tumors
Faraj et al.	56	Bladder	FFPE	5H1	> 5	18	No
Inman et al.	280	Bladder	FFPE	5H1	> 1	28	PD-L1 expression associated with higher grade and stage. No outcomes analysis
Nakanishi et al.	65	Bladder, ureter, and renal pelvis	Frozen	M1H1	> 12	71	PD-L1 expression associated with higher grade, but not overall stage. PD-L1 positivity associated with shorter OS and DSS
Wang et al.	60	Bladder	FFPE	Pdcd-1L1 (H-130)	> 10	72	PD-L1 expression associated with higher grade, muscle-invasion, recurrence, and shorter OS
Xylinas et al.	302	Bladder	FFPE	5H1	> 5	25	No significant correlation between PD-L1 and stage, recurrence, or OS

FFPE = formalin-fixed paraffin-embedded; 5H1,M1H1 = murine anti-human PD-L1 monoclonal antibodies; OS = overall survival; DSS = disease-specific survival.
*PD-L1 expression by tumor cells except for Boorjian and Bellmunt et al. who also assessed TIMCs.

Figura 32. Resultados clínico-patológicos e expressão de PDL-1 nos cânceres uroteliais.⁴⁶

No entanto, há uma necessidade **de *standardizar a determinação do PDL-1*** como valor preditivo, no sentido de eliminar a ambiguidade na preparação e classificação tecidual, uma vez que existe uma grande variabilidade dos métodos de avaliação dos vários ensaios, tanto da escolha e qualidade de anticorpos utilizados para a imunohistoquímica, como do estudo de diferentes tipos celulares no microambiente tumoral e dos diferentes valores *cut-off* para a sua positividade, variando desde 1 a 50%. Como exemplo, a expressão de PDL-1 nas células imunitárias infiltrativas correlaciona-se com um aumento da sobrevida global em pacientes que desenvolveram metástases, ao contrário da expressão de PDL-1 nas células cancerígenas, não preditivo da sobrevida. A associação entre a expressão de PDL-1 em células tumorais ou células imunitárias infiltrativas de tumores e o benefício clínico com inibidores da via PDL-1/PD-1 tem sido relatada em ensaios clínicos de Fase I.⁴⁷ Além disso, o estudo da via de sinalização de PDL-1, com base na expressão das células infiltrativas, demonstrou actividade em doentes com carcinoma urotelial avançado, que falharam ou recusaram a terapêutica *standard*.¹⁹ (figura 33)

	PD-L1 (tumor cells)				<i>P</i> ^a
	< 1%	1%–< 10%	≥10%		
All tumors (<i>n</i> = 108)	53 (49.1)	39 (36.1)	16 (14.8)	0.000054	
NMIBC (<i>n</i> = 50)	35 (70.0)	15 (30.0)	0 (0.0)		
MIBC (<i>n</i> = 58)	18 (31.0)	24 (41.4)	16 (27.6)		
	PD-L1 (immune cells)				<i>P</i> ^b
	0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)		
All tumors (<i>n</i> = 108)	47 (43.5)	44 (40.7)	17 (15.8)	0.015	
NMIBC (<i>n</i> = 50)	28 (56.0)	14 (28.0)	8 (16.0)		
MIBC (<i>n</i> = 58)	19 (32.8)	30 (51.7)	9 (15.5)		
	PD-1 (immune cells)				<i>P</i> ^b
	0+ (%)	1+ (%)	2+ (%)		
All tumors (<i>n</i> = 108)	47 (43.5)	44 (40.7)	17 (15.8)	0.0002	
NMIBC (<i>n</i> = 50)	28 (56.0)	14 (28.0)	8 (16.0)		
MIBC (<i>n</i> = 58)	19 (32.8)	30 (51.7)	9 (15.5)		
Bold values are significant values according to the definition given in M and M: <i>p</i> < 0.05.					
^a Chi-square test (<1% vs. ≥1%).					
^b Chi-square test (0+ vs. 1+/2+).					

Figura 33. Resultados da expressão de PDL-1 nas células tumorais e expressão de PDL-1 e PD-1 das células imunitárias infiltrativas, através da Imuno-Histoquímica.⁴⁷

Outro objectivo corresponde à compreensão das diferenças entre as consequências biológicas do bloqueio de PD-1 versus PDL-1. A eficácia dos anti-PD1 e anti-PDL1 depende das características de cada paciente, como o género, tipo de tumor, mutações e metástases. As taxas de resposta parecem ser mais favoráveis aos anti-PD1, apesar de os efeitos adversos serem em menor quantidade e gravidade com os anti-PDL1. O seu conhecimento mais aprofundado permitirá uma personalização terapêutica.³⁷

TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A expressão de PD-L1 por imunohistoquímica (IHQ) no carcinoma urotelial (células tumorais e células imunes que infiltram o tumor) tem vindo a ser desenvolvida no sentido de identificar doentes que possam beneficiar com a imunoterapia. Muitos ensaios clínicos têm demonstrado que os doentes com expressão positiva para PD-L1 têm maior resposta a terapêuticas anti-PD1 ou anti-PD-L1, comparados com os PD-L1 negativos.

Existem vários testes de IHQ e várias interpretações de marcação para o PD-L1; uns quantificam o PD-L1 nas células tumorais, outros nas células imunes infiltrantes, e outros em ambas, não existindo por isso um “*cutoff*” de positividade comum, sendo esta uma das grandes limitações na categorização dos doentes através do PD-L1. Um dos mais utilizados, o **PD-L1 IHC 22C3 pharmDx**, é um teste imunohistoquímico qualitativo que permite avaliar a expressão do PD-L1 em amostras de carcinoma urotelial ou metástases, fixados em formalina, em cortes histológicos de parafina. A expressão é determinada usando o **score positivo combinado (CPS)**: Células PD-L1 positivas (células tumorais, linfócitos, macrófagos) divididas pelo número total de células tumorais viáveis,

multiplicado por 100. Segundo os resultados temos duas categorias: **CPS < 10** (figura 34) e **CPS ≥ 10** (figura 35)

Por definição, as células positivas para PD-L1 no carcinoma urotelial são **células tumorais** com marcação linear completa ou incompleta da membrana celular (qualquer intensidade); e **linfócitos e macrófagos** (células inflamatórias mononucleadas) intratumorais e/ou imediatamente adjacentes ao estroma com marcação de membrana e/ou citoplasmática. O relatório anatomopatológico deve incluir o CPS numerário e a categoria de CPS.⁴⁸

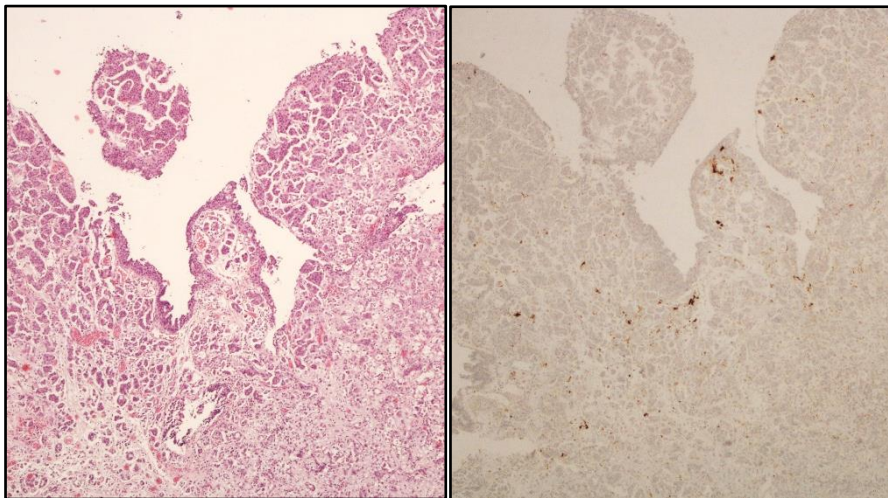


Figura 34. Expressão de PD-L1: CPS<10.⁴⁸

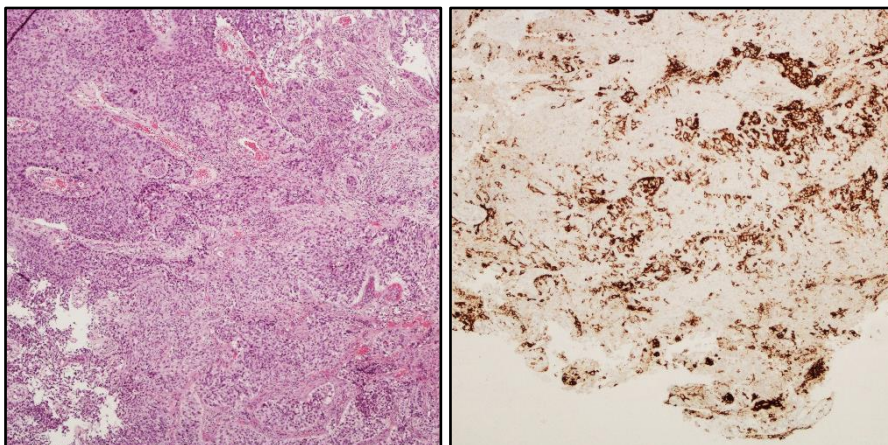


Figura 35. Expressão de PD-L1: CPS≥10.⁴⁸

7.2. Perfis de expressão genética

O aumento do **conhecimento da genômica do cancro** está a modificar o diagnóstico e terapêutica dos cancros génito-urinários. Torna-se claro que assinaturas genômicas individuais do cancro conduz a diferentes prognósticos e decisões terapêuticas, apesar

destas terapias dirigidas ainda serem bastante limitadas. A distinção histopatológica clássica dos cânceres uroteliais entre os NMIBC e os MIBC reflecte subgrupos genómicos paralelos. Os mais comuns, os papilares NMIBC de **baixo grau**, apresentam, frequentemente, mutações nos genes HRAS e FGFR3. Os tumores de **alto grau**, invasivos, apresentam uma grande frequência de mutações do supressor de tumor TP53, do Retinoblastoma (RB) e do gene CDKN2A.⁴³

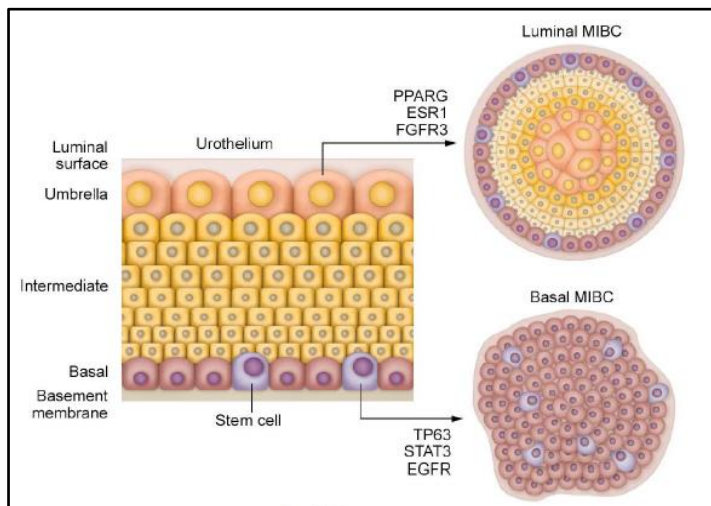


Figura 36. Tumores MIBC: grupos basal e luminal.¹¹

Na verdade, muitos dos estudos genómicos têm tido um maior foco nos MIBC, distinguindo-se dois grandes grupos: basal e luminal. (figura 36) O **grupo basal** apresenta dois subgrupos: o *squamous-like* (**cluster III**), que apresenta uma sobreexpressão de marcadores basais como o K5 e o K14 e uma subregulação de marcadores de diferenciação como o K20 e o FOXA1; e o *claudin-low* (**cluster IV**), caracterizado pela transição epitélio-mesenquimatosa. O **grupo luminal**, por sua vez, também apresenta dois subgrupos: o *urothelial-like* (**cluster I**), caracterizado por uma diferenciação urotelial e mutações na via FGFR3; e o *p53-like* (**cluster II**), também com marcadores de diferenciação urotelial, mas através da amplificação do PPARG, GATA-3 e ERBB2. No geral, os subtipos basais têm um pior prognóstico, mas uma melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante, enquanto que os *p53-like* são os mais quimio-resistentes. As maiores taxas de resposta aos inibidores *checkpoint* imunitários foram encontradas no cluster II, estando o benefício clínico associado a uma elevada expressão de genes imunitários. A prevalência de PDL-1, por sua vez, é maior nos clusters basais, sugerindo a existência de outros factores imunossupressores, que previnem a activação das células T.⁴³ (figura 37)

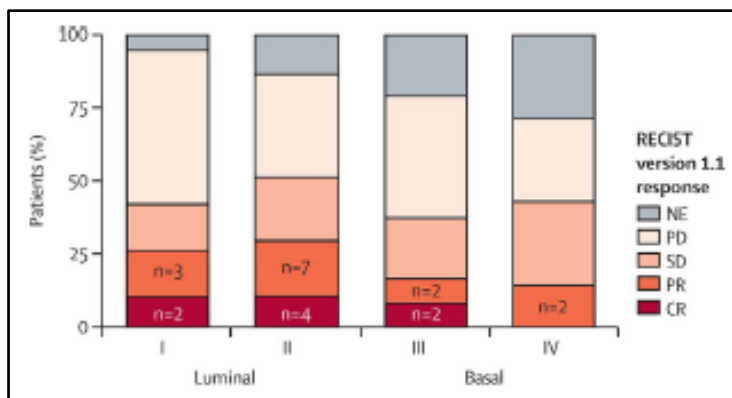


Figura 37. Resposta dos diferentes clusters à Imunoterapia.⁴³

A imunoterapia está a adquirir, gradualmente, um papel importante no algoritmo terapêutico para pacientes com cancro urotelial. O aumento do conhecimento da genómica tumoral suporta a estratificação de pacientes para terapêuticas dirigidas. Para que esta seja possível, a existência de biomarcadores é crucial, sendo que a existência de apenas um isolado não deverá ser possível, dado o dinamismo das respostas imunitárias. A história do sucesso da imunoterapia vai conduzir a um uso mais eficiente destes agentes, com doses e tempo de administração correctos, em estádios mais precoces da doença, em singular ou em combinação com outras medicações imunoterapêuticas (vacinas, transferências de células T, citocinas, vírus oncolíticos...) ou quimioterapêuticas, ou com outras modalidades como a radioterapia ou a cirurgia, com um aumento significativo das taxas de sobrevivência destes pacientes. Inúmeros estudos estão em curso no sentido de investigar o papel da imunoterapia, tanto nos cancros uroteliais não músculo-invasivos, como também nos músculo-invasivos localmente avançados e/ou metastizados, como adjuvância e neoadjuvância.⁴⁹

AGRADECIMENTOS

Após a realização deste trabalho, gostaria de agradecer toda a disponibilidade e conhecimento demonstrados pela Dra. Lurdes Correia, desde o primeiro minuto que decidi aceitar este desafio e traçar comigo este trilho de tamanha responsabilidade. Quero também agradecer ao Instituto de Anatomia Patológica do Hospital Santa Maria e à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, por me proporcionarem todas as ferramentas necessárias à realização deste trabalho e, por fim, a todos os colegas, amigos e família que me acompanharam neste projeto, transmitindo a confiança e motivação imprescindíveis para que esta tese tenha sido planeada e executada com o máximo de afinho e dedicação, ajudando-me a crescer, tanto a nível pessoal como a nível profissional.

BIBLIOGRAFIA

1. Holger Moch, Peter A. Humphrey, Thomas M. Ulbright, Victor E. Reuter (2016). WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *WHO (4th Edition), Lyon*, 77-107.
2. Martinez Rodriguez, R. H., Buisan Rueda, O., & Ibarz, L. (2017). Bladder cancer: Present and future. *Medicina Clínica (English Edition)*, 149(10), 449–455.
3. Spiess, P. E., Agarwal, N., Bangs, R., Boorjian, S. A., Buyyounouski, M. K., Clark, P. E., Gurski, L. A. (2017). Bladder Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(10), 1240–1267.
4. FI-WARE, Pérez, M., & Binders, B. L. R. (2003). Table of of contents. *WD Info*, 3(2), 2004.
5. Bertz, S., Eckstein, M., Stoehr, R., Weyerer, V., & Hartmann, A. (2017). Urothelial Bladder Cancer: An Update on Molecular Pathology with Clinical Implications. *European Urology, Supplements*, 16(12), 272–294.
6. Cowan, N. C., Santis, M. De, Witjes, J. A., Lebre, T., Compe, E. M., Espino, E. L., Ribal, M. J. (2017). Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer, 71, 462–475.
7. Zichi, C., Tucci, M., Leone, G., Buttigliero, C., Vignani, F., Pignataro, D., ... Di Maio, M. (2017). Immunotherapy for patients with advanced urothelial cancer: Current evidence and future perspectives. *BioMed Research International*, 2017, 4602–4608.
8. Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Babjuk, M., Bo, A., Herna, V., Zigeuner, R. (2017). EAU Guidelines on Non – Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder : Update 2016, 71, 447–461.
9. Donin, N. M., Lenis, A. T., Holden, S., Drakaki, A., Pantuck, A., Belldegrun, A., & Chamie, K. (2017). Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *Journal of Urology*, 197(1), 14–22.
10. Faltas, B. M., & Tagawa, S. T. (2017). Immune-checkpoint blockade in cisplatin-ineligible patients with urothelial cancer. *The Lancet*, 389(10064), 6–7.

11. Siefker-Radtke, A. O., Apolo, A. B., Bivalacqua, T. J., Spiess, P. E., & Black, P. C. (2018). Immunotherapy with Checkpoint Blockade in the Treatment of Urothelial Carcinoma. *Journal of Urology*, 199(5), 1129–1142.
12. Farina, M. S., Lundgren, K. T., & Bellmunt, J. (2017). Immunotherapy in Urothelial Cancer: Recent Results and Future Perspectives. *Drugs*, 77(10), 1077–1089.
13. Azevedo, R., Ferreira, J. A., Peixoto, A., Neves, M., Sousa, N., Lima, A., & Santos, L. L. (2015). Emerging antibody-based therapeutic strategies for bladder cancer: A systematic review. *Journal of Controlled Release*, 214, 40–61.
14. Rotte, A., Jin, J. Y., & Lemaire, V. (2018). Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Annals of Oncology*, 29(1), 71–83.
15. Özdemir, B. C., Siefker-Radtke, A. O., Campbell, M. T., & Subudhi, S. K. (2017). Current and Future Applications of Novel Immunotherapies in Urological Oncology: A Critical Review of the Literature. *European Urology Focus*, 1–13.
16. Zichi, C., Tucci, M., Leone, G., Buttigliero, C., Vignani, F., Pignataro, D., Di Maio, M. (2017). Immunotherapy for patients with advanced urothelial cancer: Current evidence and future perspectives. *BioMed Research International*, 2017.
17. Carosella, E. D., Ploussard, G., LeMaout, J., & Desgrandchamps, F. (2015). A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. *European Urology*, 68(2), 267–279.
18. Arasanz, H., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Ibañez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G., & Escors, D. (2017). PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*, 8(31), 51936–51945.
19. Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Frontiers in Pharmacology*, 8(AUG), 1–15.
20. Patel, R., Bock, M., Polotti, C. F., & Elsamra, S. (2017). Pharmacokinetic drug evaluation of atezolizumab for the treatment of locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(2), 225–232.

21. Crist, M., & Balar, A. (2017). Atezolizumab in invasive and metastatic urothelial carcinoma. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 10(12), 1295–1301.
22. Balar, A. V, Galsky, M. D., Rosenberg, J. E., Powles, T., Petrylak, D. P., Bellmunt, J., Eigl, B. J. (n.d.). Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma : a single-arm , multicentre , phase 2 trial, 67–76.
23. A.M., A., S.L., W., R.C., H., M., B., A., B., Y., L., & V., M. (2017). Spotlight on atezolizumab and its potential in the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *OncoTargets and Therapy*, 10, 1487–1502.
24. Plimack, E. R., Bellmunt, J., Gupta, S., Berger, R., Chow, L. Q. M., Juco, J., O'Donnell, P. H. (2017). Safety and activity of pembrolizumab in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-012): a non-randomised, open-label, phase 1b study. *The Lancet Oncology*, 18(2), 212–220.
25. Balar, A. V., Castellano, D., O'Donnell, P. H., Grivas, P., Vuky, J., Powles, T., Bellmunt, J. (2017). First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 18(11), 1483–1492.
26. Lavoie, J. M., Bidnur, S., Black, P. C., & Eigl, B. J. (2017). Expanding Immunotherapy Options for Bladder Cancer: Commentary on: Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *Urology*, 106, 1–2.
27. Sidaway, P. (2017). Bladder cancer: Pembrolizumab is superior to chemotherapy. *Nature Reviews Urology*, 14(5), 261.
28. Massard, C., Gordon, M. S., Sharma, S., Rafii, S., Wainberg, Z. A., Luke, J., Segal, N. H. (2016). Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(26), 3119–3125.
29. Bellmunt, J., Powles, T., & Vogelzang, N. J. (2017). A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treatment Reviews*, 54, 58–67.
30. Apolo, A. B., Infante, J. R., Balmanoukian, A., Patel, M. R., Wang, D., Kelly, K., Gulley, J. L. (2017). Avelumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody,

- In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study. *J Clin Oncol*, 35(19), 2117–2124.
31. Sugama, S., Sekiyama, K., Kodama, T., Takamatsu, Y., Hashimoto, M., Bruno, C., Jolla, L. (2017). HHS Public Access, 17(11), 39–46.
 32. Sharma, P., Retz, M., Siefker-radtke, A., Baron, A., Necchi, A., Bedke, J., Azrilevich, A. (2017). Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre , 18(March).
 33. Necchi, A., Raggi, D., Giannatempo, P., Sonpavde, G., Galsky, M. D., Bellmunt, J., Miceli, R. (2017). From the Uncertainties to the Evidence : A Brief History of Immunotherapy as Salvage Therapy for Advanced Bladder Cancer Through a. *Clinical Genitourinary Cancer*, 15(5), 509–512.e9.
 34. McDaniel, A. S., Alva, A., Zhan, T., Xiao, H., Cao, X., Gursky, A., Mehra, R. (2016). Expression of PDL1 (B7-H1) Before and After Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma. *European Urology Focus*, 1(3), 265–268.
 35. Singh, P., & Black, P. (2016). Emerging role of checkpoint inhibition in localized bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 34(12), 548–555.
 36. Aoun, F., Kourie, H. R., Sideris, S., Roumeguère, T., Velthoven, R. Van, & Gil, T. (2015). Checkpoint inhibitors in bladder and renal cancers: Results and perspectives. *Immunotherapy*, 7(12), 1259–1271.
 37. El Osta, B., Hu, F., Sadek, R., Chintalapally, R., & Tang, S. C. (2017). Not all immune-checkpoint inhibitors are created equal: Meta-analysis and systematic review of immune-related adverse events in cancer trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 119(August), 1–12.
 38. Gupta, S., Gill, D., Poole, A., & Agarwal, N. (2017). Systemic immunotherapy for urothelial cancer: Current trends and future directions. *Cancers*, 9(2), 1–14.
 39. Wang, Q., & Wu, X. (2017). Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *International Immunopharmacology*, 46, 210–219.
 40. Diesendruck, Y., & Benhar, I. (2017). Novel immune check point inhibiting antibodies in cancer therapy—Opportunities and challenges. *Drug Resistance Updates*, 30, 39–47.

41. Marcucci, F., Rumio, C., & Corti, A. (2017). Tumor cell-associated immune checkpoint molecules – Drivers of malignancy and stemness. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1868(2), 571–583.
42. Bellone, M., & Elia, A. R. (2017). Constitutive and acquired mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade in human cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 36, 17–24.
43. Gevaert, T., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., Van Leenders, G., Allory, Y., De Ridder, D., Libbrecht, L. (2017). Genito-urinary genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatment. *Seminars in Cancer Biology*, (October), 0–1.
44. Gibney, G. T., Weiner, L. M., & Atkins, M. B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*, 17(12), e542–e551.
45. Teng, F., Meng, X., Kong, L., & Yu, J. (2018). Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunotherapy: A systematic review. *Cancer Letters*, 414, 166–173.
46. Zhou, T. C., D, M., Sankin, A. I., D, M., Porcelli, S. A., D, M., Ph, D. (2017). A review of the PD-1 / PD-L1 checkpoint in bladder cancer : From mediator of immune escape to target for treatment 1. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 35(1), 14–20.
47. Le Goux, C., Damotte, D., Vacher, S., Sibony, M., Delongchamps, N. B., Schnitzler, A., Pignot, G. (2017). Correlation between messenger RNA expression and protein expression of immune checkpoint–associated molecules in bladder urothelial carcinoma: A retrospective study. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 35(5), 257–263.
48. *PD-L1 IHC 22C3 pharmDx*; Guia de Interpretação 2018 – *Carcinoma Urotelial*.
49. Aggen, D. H., & Drake, C. G. (2017). Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: A moving target. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), 1–13.